

THESE

présentée

à la FACULTE DE PHARMACIE

de l'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
diplôme d'état

par

Pierre GANTES
pharmacien
licencié es-sciences

né le 5 Juin 1926

titre de la thèse : Le rôle de l'analyse au divers stades de l'étude d'un médicament nouveau.
Exemple de l'acide Polymyxine-méthylène-sulfonique.

soutenue le : 11 Décembre 1970

devant la commission d'examen : M. P. MALANGEAU } président
M^{lle} S. LAMBIN }
M. F. PELLERIN } examinateurs

THESE

présentée

à la FACULTE DE PHARMACIE

de l'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE
diplôme d'état

par

Pierre GANTES
pharmacien
licencié es-sciences

né le 5 Juin 1926

titre de la thèse : Le rôle de l'analyse au divers stades de l'étude d'un médicament nouveau.
Exemple de l'acide Polymyxine-méthylène-sulfonique.

soutenue le : 11 Décembre 1970

devant la commission d'examen : M. P. MALANGEAU } président
M^{lle} S. LAMBIN }
M. F. PELLERIN } examinateurs



PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M.	QUEVAUVILLER A.		Doyen, Président du Conseil transitoire de Gestion
M.	GUIGNARD J-L.		Assesseur
M.	RODINEAU L.	+	Secrétaire Général
Mme	FERRARI S.		Attaché Principal d'Administration Universitaire Adjointe au Secrétaire Général
M.	BRENN A.	+	Attaché Principal d'Intendance Universitaire
M.	JEANDEL L.		Attaché d'Administration Universitaire
M.	JACOB A.	+	Attaché d'Administration Universitaire
Mlle	FRIZOL E.		Attaché d'Administration Universitaire

DOYENS HONORAIRES

M.	VALETTE	Guillaume	O +
M.	MALANGEAU	Pierre	

PROFESSEURS HONORAIRES

M.	LAUNOY L.		O +
M.	FLEURY P.		O +
M.	PICON M.		O +

PROFESSEURS

M.	JANOT M-M	O +	Membre de l'Institut.. Pharmacie Galénique (T)
M.	VALETTE G.	O +	Pharmacodynamie (T)
M.	PARIS R.	O +	Matière médicale (T)
M.	GUILLOT M.	O +	Physique (T)
M.	GAUTIER J-A.	O +	Chimie organique (T)

Mlle LAMBIN S.	+	Microbiologie (T)
M. RAOUL Y.	+	Physiologie (T)
M. COURTOIS J.	+	Chimie biologique (T)
M. DOMANGE L.	O +	Chimie générale et minérale (T)
M. TRUHAUT R.	C + Membre de l'Institut...	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M. MORETTE A.	+	Hydrologie (T)
M. CAVIER R.	+	Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A.	+	Hygiène et Education sanitaire (T)
M. MOREAU R.	+	Pharmacie chimique (T)
M. GERMAN A.		Microbiologie (T)
M. PIETTE M.	+	Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.		Chimie analytique (T)
M. GIRARD M.	+	Biochimie appliquée (T)
M. DILLEMANN G.		Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. DEYSSON G.	+	Botanique (T)
M. FLAHAUT J.		Minéralogie (T)
M. RENAULT J.		Chimie organique (T)
M. LE HIR A.		Pharmacie galénique (T)
M. BOUDENE C.		Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M. LARUELLE P.		Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.		Pharmacodynamie (T)
M. MANGEOT A.		Pharmacie galénique industrielle (T)
M. DELAVEAU P.		Séméiologie et Pathologie générale (T)
M. COHEN Y.		Pharmacodynamie (T)
M. RENAULT H.		Physique (T)
M. BOURDON R.		Chimie analytique (T)
M. REYNAUD P.		Pharmacie chimique (T)
M. LE MOAN R.		Toxicologie
M. POISSON J.		Pharmacie galénique
M. MICHEL R.		Endocrinologie (T)

M.	LECLERC M.		Hématologie
M.	PERCHERON F.		Chimie biologique
M.	SAVEL J.		Biologie animale
M.	DESVIGNES A.		Cryptogamie et Technique bactériologique
M.	MIOCQUE M.		Chimie organique.

MAITRES DE CONFERENCES

M.	PAOLETTI C.		Toxicologie (T)
M.	BORY J.		Microbiologie (T)
M.	GUIGNARD J-L.		Botanique générale (T)
M.	GOUNELLE J-C.		Physiologie (T)
M.	BINET P.		Biologie animale (T)
M.	COMBET-FARNOUX C.		Chimie organique
M.	PLAT M.		Chimie analytique (T)
Mme	PLAT M.		Législation et Déontologie pharmaceutique (T)
M.	DELACOUX E.		Pharmacie chimique (T)
M.	CAVÉ A.		Matière médicale (T)
M.	PUISIEUX F.		Pharmacie galénique (T)
M.	DUCHON D'ENGENIERES M.		Chimie organique (T)
M.	ADOLPHE C.		Physique (T)
M.	GUERNET M.		Chimie analytique (T)
M.	DIDRY J.		Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales (T)
M.	KHODADAD P.		Chimie minérale (T)
M.	PERLES R.		Chimie biologique (S)
M.	LEMONNIER A.		Biochimie appliquée (S)
M.	YONGER J.		Chimie analytique (S)
M.	HAMON M.		Chimie analytique (S)
M.	MESTRE J.		Botanique (S)
M.	AGNERAY J.		Biologie (S)
M.	DREUX C.		Biochimie appliquée (S)
M.	RIVET J.		Chimie générale et minérale (S)

M.	ETIENNE J.	Mathématiques (S)
M.	HAZEBROUCQ G.	Physique (S)
M.	ROUSSELET F.	Biochimie appliquée (S)
M.	BOURRINET P.	Hygiène (S)
M.	SOULEAU Ch.	Chimie générale et minérale (S)
Mme	HUBERT J.	Microbiologie (délég.)
Mlle	BOURNIQUE C.	Botanique (délég.)

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M.	GESTEAU P.	+
M.	GUERIN H.	+
Mme	HARISPE M.	
Mlle	LONGUEVALLE S.	
M.	HARISPE	+

MAITRES-ASSISTANTS ET CHEFS DE TRAVAUX

M.	ANDRÉ Guy	TP Pharmacie galénique 2-3e A (délég.)
M.	ADAM Yves	TP Pharmacie chimique 5e A (Synthèse médicaments) (T)
M.	AYMARD Pierre	ED Physiologie-Histologie (T)
Mlle	BARNIER S.	Mathématiques (délég.)
Mlle	BENOIS Martine	TP Botanique 2e A (délég.)
Mlle	BERNARD J.	TP Bactériologie 5e A Industrie (T)
M.	BESANCON Pierre	Mathématiques (S)
Mme	BLANC Jeanine	ED Chimie organique 1-2 A (T)
Mme	BONALY J.	ED Botanique 1 A (délég.)
Mme	BOSIO A-Marie	TP Chimie qualitative (délég.)
M.	BOURLIOUX Pierre	CES Bactériologie (délég.)
M.	CAILLARD Claude	TP Pharmacodynamie 4-5 A (délég.)
M.	CANAL Jacques	ED et TP Biochimie appliquée 5 A - Biologie officine (délég.)
M.	CARRE Daniel	Mathématiques (délég.)
Mlle	CARRERE Clothilde	TP Microbiologie 4 A (T)
Mme	CENAC Jacqueline	CES Parasitologie (T)

Mme CHARDENOT P.		Chimie Biologique 3-4 A (T)
Mme CHARPENTIER M.		ED Chimie générale et minérale 1ère A (T)
M. CHERON J.Marie		TP Chimie Biologique 3-4 A (délég.)
Mlle CLAIR Geneviève		ED Matière médicale 3-5 A (T)
M. DAGRON Christian		ED Chimie générale et minérale 2 A (T)
M. DAVY Jean		CES Biochimie (délég.)
M. DEBRAY M.		Mathématiques (délég.)
Mlle DECAUDIN M-Thérèse		TP Parasitologie 4 A (T)
M. DELATTRE Jacques		CES Electrochimie et TP 5 A Biologie (délég.)
M. DELCOURT Alain		ED Botanique 2 A (délég.)
M. DOUSSIN Alexandre		TP Chimie analytique 5 A
Mlle DUCHENE Dominique		CES Pharmacie galénique industrielle (délég.)
Mlle DUMANT Geneviève		CES Analyse physico-chimique des médicaments
Mme DUPONT Charlotte		CES Pharmacodynamie (T)
M. ETIENNE Guy		TP Pharmacie galénique 2-3 A (T)
Mme FAURE Liliane		ED Chimie organique 1-2 A (T)
Mlle FLEURY Solange		ED Chimie analytique quantitative (T)
Mlle FOGLIETTI M-José		TP Chimie biologique 3-4 A (T)
M. GAIRARD Alexis		CES Contrôle médicaments (biologie) (délég.)
M. GAYRAL Philippe		TP Zoologie 1 A (délég.)
Mme BOY Françoise		Mathématiques (délég.)
M. GIRARDEAU J-F		TP Chimie organique 5 A (synthèse organique) (délég.)
M. GOBERT Jean		TP Zoologie 1 A (S)
Mlle GOURSAT M-José		ED Botanique 1 A (T)
M. GROSSIORD J-Louis		TP Physique 1 A (délég.)
Mlle GUILLOUX Edith		TP Chimie biologique 3-4 A (S)
M. HENRY Jacques		Essais médicaments chimiques et galéniques (T)

Mme	JULIEN Maud		ED Physique 2 A (T)
M.	JULIEN René		ED Chimie générale 1 A (T)
Mlle	JUND Yvonne		CES Microbiologie et contrôle médicaments - Microbiologie (T)
M.	LALEGERIE Pierre		CES Biologie (S)
M.	LAROCHE Jacques		TP 5 A - Secourisme - Hygiène Education sanitaire (T)
Mme	LEDUC Yvette		TP Chimie analytique qualitative (T)
M.	LEGENDRE Lucien		TP Chimie organique 2 A
Mme	LEGER Nicole		Parasitologie 5 A (T)
M.	LELUC Robert		CES Bactériologie (T)
M.	LEMAY René		CES Législation (T)
Mme	LE QUANG THUAN		TP Chimie analytique qualit.(S)
M.	LEVILLAIN Pierre		ED Chimie analytique qualit.(T)
Mme	LEVY Françoise		ED Botanique 2 A (délég.)
M.	LIKFORMAN Joseph		ED Physique 1 A (T)
Mlle	LONGEVIALLE M.		ED Botanique 1 A (T)
M.	MAHUZIER Georges		TP Chimie analytique quantit.(T)
M.	MANDEREAU Jean		CES Pharmacotechnie chimique (T)
M.	MANET Léon		CES Biochimie (T)
M.	MARTIN-FRERE H.		TP Chimie générale et minérale lère A (T)
M.	MAUGUEN Yves		Mathématiques (délég.)
Mme	MAYRARGUE Joëlle		ED Chimie organique 1-2 A(délég.)
Mlle	MICHELET Annick		ED Chimie générale et minérale 2 A (T)
M.	MOULIN Pierre		TP Physique 1 A (délég.)
Mme	MOURY Jacqueline		TP Zoologie 1 A (S)
Mme	NOTTEGHEM M-J		ED Parasitologie 4 A (T)
M.	NGUYEN Phu Lich		CES Toxicologie (délég.)
Mme	PANOUSE Jacqueline		CES Microbiologie - Virologie Immunologie (T)
Mme	PAOLAGGI Françoise		CES Electrochimie et TP 5 A Biologie (T)
M.	PESTIS Jean		TP Anatomie, Physiologie humaine

Mme	PIETTE Colette		CES Hématologie 5 A Biologie(T)
M.	POULLAIN Pierre		CES Hématologie 5 A Biologie(T)
M.	POUSSET J-Louis		TP Chimie extractive 5 A (T)
M.	QUENEZ Pierre		TP Chimie générale et minérale 1 A (T)
Mme	RABIANOT Odile		ED Chimie analytique qualit. (S)
M.	RABARON Alain		CES Pharmacotechnie galénique (délég.)
Mme	ROBERT Monique		CES Immunologie - Microbiologie (T)
M.	RODIER Noël		ED Physique 2 A (S)
Mlle	ROLLEN Alice		TP Botanique 1 A (T)
Mlle	ROUSSELET Renée		Essais médicaments végétaux (T)
Mme	RUDLER Michèle		ED Chimie organique 1-2 A (délég.)
Mme	SALES Nicole		TP Physiologie, Histologie (T)
Mlle	SEBASTIEN Francine		TP Microbiologie 5 A (Biologie officine) (délég.)
M.	SCHUSTER Jean		Essais des médicaments chimiques et galéniques (T)
Mlle	SORIA Claudine		Biologie officine 5 A (S)
Mme	SEILLER Monique		TP Pharmacie galénique industrielle (T)
Mlle	STRUPLER Nicole		ED Chimie générale et minérale 1 A (T)
M.	TOUBOUL J-Pierre		TP Chimie analytique 5 A (délég.)
M.	TRIEU Thuong Cong		TP Chimie analytique quant.(T)
Mlle	TROUPEL Solange		TP Chimie analytique quant.(S)
Mme	VAN AMERONGEN G.		ED Chimie analytique quant. (délég.)
M.	VAYSSIÈRE J-Michel		ED Chimie organique 1-2 A (délég)
M.	VILLERS Jacques		TP Physique 2 A (T)
Mme	WELBY Josette		TP Pharmacie galénique (S)

BIBLIOTHEQUE

Mlle RUYSSSEN Y.	+	Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A.		Conservateur
Mme COULET M.A		Conservateur
Mlle LANGLOIS C.		Conservateur
N...		Conservateur

Légion d'Honneur	(+	Chevalier
	(O	Officier
	(C	Commandeur

Liste mise à jour au 15 Septembre 1970.

A MA GRAND-MERE,

A MES PARENTS.

A Monsieur le Professeur P. MALANGEAU

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien en Chef des Hôpitaux Psychiatriques
de la Seine,

qui a accepté la Présidence de cette thèse, en
témoignage de notre profond respect.

A Mademoiselle le Professeur S. LAMBIN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui a bien voulu accepter de participer au Jury de
notre thèse, en témoignage de notre vive gratitude.

A Monsieur le Professeur F. PELLERIN

Professeur à la Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de Rouen,

Pharmacien en Chef de l'Hôpital Général d'Eaubonne

qui nous a aidé et guidé dans la rédaction de cette
thèse en nous apportant ses conseils positifs.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre
reconnaissance.

I N T R O D U C T I O N

L'évolution d'un médicament depuis son élaboration jusqu'à son élimination, implique la participation de l'analyse ; elle doit résoudre à la fois des problèmes pratiques de mise au point de techniques et des problèmes de recherche aux différents stades, orientant le galéniste sur le choix d'une forme d'administration stable et convenable, renseignant le toxicologue et le biologiste sur le comportement et les transformations que le médicament subit dans l'organisme. La solution des multiples problèmes est obtenue en choisissant dans l'arsenal des méthodes physiques, chimiques, microbiologiques ou toxicologiques, celles qui s'adaptent le mieux à chaque cas particulier. Il en va ainsi en matière d'antibiotiques et le présent travail a pour objet de mettre en évidence l'apport de l'analyse en prenant l'exemple des Polymyxines et de leurs dérivés méthylènesulfoniques.

Nous avons tenté de montrer comment l'analyste, en ayant recours à des procédés classiques, est amené à mettre au point un procédé nouveau de fabrication, à étudier et expliquer le mécanisme des réactions chimiques mises en jeu et à donner les preuves de l'identité du produit obtenu.

Les anomalies décelées par l'analyse au cours de l'étude de la mise en forme galénique ont permis de mettre en évidence la formation d'un composé différent qui a été ensuite étudié comparativement avec le composé originel.

Nous tenons, tout d'abord, à remercier particulièrement Monsieur le Doyen Malangeau de vouloir bien accepter la Présidence du Jury de notre thèse. Nous avons plusieurs fois recouru à ses conseils et il nous a toujours manifesté sa bienveillance. Nous lui en sommes très reconnaissant.

Nous remercions également Mademoiselle le Professeur Lambin d'avoir accepté de participer au Jury de cette thèse dont une partie est bactériologique.

Monsieur le Professeur Pellerin s'est chargé avec amitié et efficacité de guider la rédaction de notre travail et il nous a donné les conseils éclairés qui nous ont permis de mener à bien notre étude. Nous l'en remercions vivement.

C'est avec Monsieur le Professeur Vargues de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Tours que nous avons commencé ce travail, il y a deux ans déjà, et nous le remercions particulièrement pour la première orientation et le dynamisme qu'il a su nous inculquer.

Grâce à l'obligeance de Madame J. Khoury, Bibliothécaire de cette Faculté, nous avons pu effectuer la plupart de nos travaux de bibliographie. Qu'elle accepte également toute notre reconnaissance.

Si nous avons pu poursuivre ce travail avec le secours capital d'un appareillage analytique important dans le Centre de Recherche des Etablissements Pfizer-Clin à Amboise, c'est grâce à l'obligeante compréhension de Monsieur le Docteur J. Clément, Directeur Scientifique de ce Centre. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de nos remerciements profonds.

Enfin nous remercions tous ceux qui nous ont aidé matériellement ou par leurs conseils à cheminer jusqu'à la solution d'un problème ardu.

Notre travail comprend sept parties :

Dans la première partie, nous rappelons quelques généralités sur la structure des polymyxines et de leurs dérivés méthylsulfoniques ainsi que sur les modes classiques de préparation de ces derniers.

La deuxième partie est consacrée à l'étude des méthodes analytiques mises en jeu ; ces méthodes sont classiques mais nous avons toutefois été amené à apporter quelques précisions d'ordre technique et à les adapter à des cas particuliers.

Les troisième et quatrième parties décrivent respectivement les méthodes d'analyse et l'étude toxicologique.

La cinquième partie étudie la fabrication de l' A.P.M.S. que notre étude analytique a permis de mettre au point.

La sixième partie traite de la mise en forme pharmaceutique qui nous a amené à mettre en évidence la formation d'un dérivé nouveau présentant la même activité que l' A.P.M.S. et encore moins toxique.

La septième partie montre le rôle de l'analyse dans l'étude du métabolisme de l'antibiotique et de son élimination.

CHAPITRE 1 : GENERALITES

I - GENERALITES SUR LES POLYMYXINES

Les Polymyxines appartiennent au groupe des antibiotiques polypeptidiques dont les chaînes sont très souvent refermées en cycle au moyen d'un chaînon peptidique.



C'est le cas de la Polymyxine B (Tableau I).

C'est également le cas des Tyrocidines A et B et des Gramicidines S, J et J₂ (Tableau II).

Ces antibiotiques sont produits par des Bacillus. Seule, en tant qu'antibiotique polypeptidique, la Viomycine est produite par un Streptomyces. Les divers antibiotiques de ce groupe sont en général fortement basiques et il est intéressant de noter que ceux qui ont le plus grand nombre de groupes basiques, par molécule, comme la Polymyxine (5), sont actifs contre les bacilles Gram négatifs, alors que ceux qui ont un plus petit nombre de ces groupes basiques, comme la Gramicidine S (2) (Tableau II), sont actifs sur les germes Gram positifs.

Les antibiotiques figurant dans le Tableau II ne présentent qu'un enchaînement cyclique. Au contraire, les Polymyxines présentent une chaîne peptidique supplémentaire à laquelle sont accrochés des acides gras saturés.

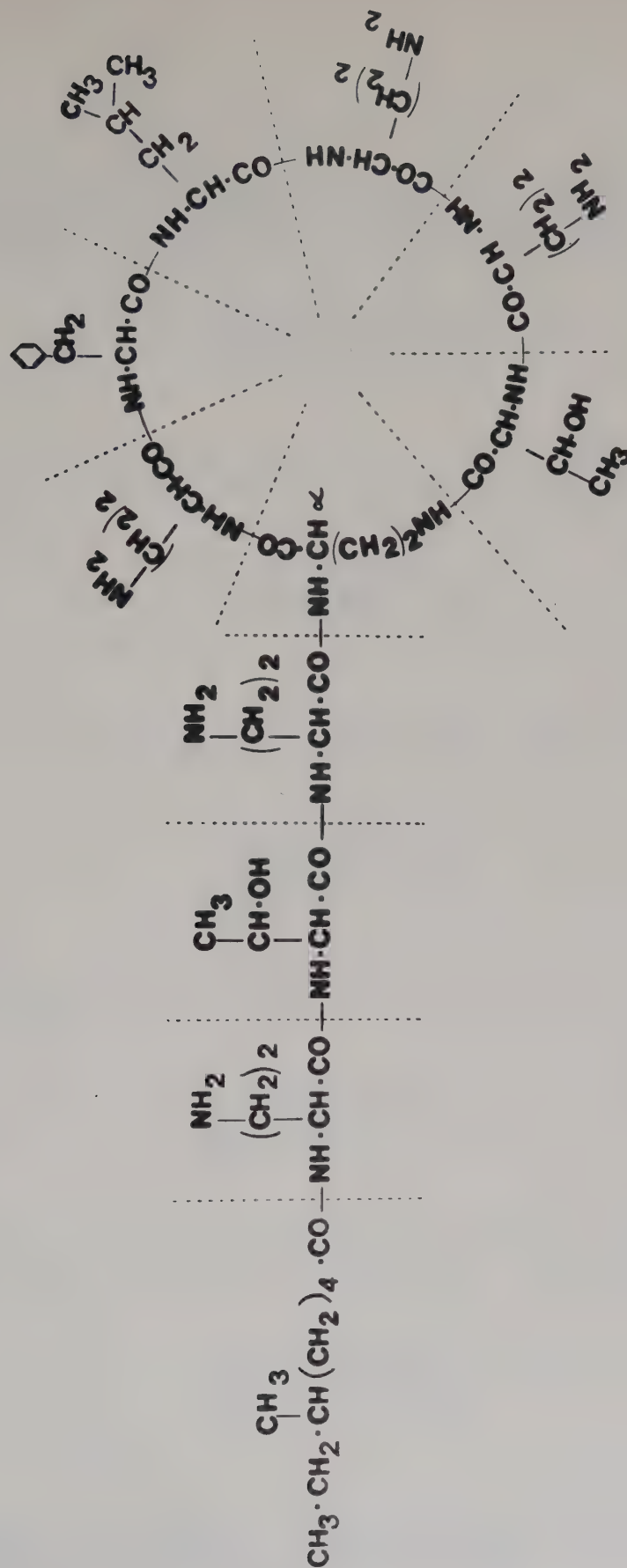


TABLEAU I : FORMULE DE LA POLYMYXINE

Val → Orn → Leu → D.Phe → Pro → Phe → D.Phe → Asp (NH₂) → Glu (NH₂) → Tyr

TYROCIDINE A

Val → Orn → Leu → D.Phe → Pro → Tyr → D.Phe → Asp (NH₂) → Glu (NH₂) → Tyr

TYROCIDINE B

Val → Orn → Leu → D.Phe → Pro → Val → Orn → Leu → D.Phe → Pro

GRAMICIDINE S

Val → D.Orn → Pro → Phe → D.Leu → D.Phe → Orn

GRAMICIDINE J

Val → D.Orn → Pro → D.Phe → D.Leu → Orn

GRAMICIDINE J₂

TABLEAU II : EXEMPLES DE QUELQUES ANTIBIOTIQUES POLYPEPTIDIQUES CYCLIQUES

(Dans ce groupe de formules, le signe → correspond à la liaison CO - NH).

Isolement :

En Juillet 1947, trois chercheurs : BENEDICT, LANGLYKKE (10) et STANSLY (100) travaillant séparément, isolèrent le même antibiotique du *Bacillus polymyxa*, et un mois plus tard, AINSWORTH et Collaborateurs (1), décrivirent l'extraction d'un produit similaire à partir des cultures de *Bacillus aerosporus* (111).

Ces deux substances, baptisées Polymyxine et Aérosporine, ayant des propriétés physiques analogues, ont été isolées des milieux de culture par adsorption sur charbon ; après élution par l'acétone aqueuse, elles ont été purifiées par l'intermédiaire des picrates. La parenté de la Polymyxine et de l'Aérosporine était très grande (8).

Le *Bacillus polymyxa* est une souche très répandue dans les sols et finalement, une conférence internationale montra que le *Bacillus aerosporus* appartenait à la famille du *Bacillus polymyxa* et que parmi les produits du métabolisme de ces diverses souches de *Bacillus polymyxa* on pouvait définir cinq antibiotiques principaux, désignés sous le nom de Polymyxines A, B, C, D, E, (11) (18) (65) (86) (91).

L'Aérosporine fut identifiée à la Polymyxine A et le produit isolé par STANSLY et Coll. à la Polymyxine D, (27). Plus récemment, un nouveau membre de ce groupe, la Polymyxine M a été isolé à partir des cultures d'une souche de *Bacillus polymyxa*, issue d'un échantillon de sol moscovite (96). Dernièrement, un certain nombre d'auteurs japonais ont décrit (69), une Polymyxine P qui a été isolée d'une culture de la souche T 39, elle-même identifiée au *Bacillus polymyxa*.

Rappel des conditions de fermentation et d'isolement de

l'antibiotique : (11) (100)

La Polymyxine B est produite par le *Bacillus polymyxa* BENEDICT et LANGLYKKE (1947), microorganisme Gram négatif de la famille des Bacillacées.

Le germe est sporulé aérobie et présente les caractères de fermentation suivants :

. Dextrose	+	Acétyl-méthylcarbinol	+
. Lactose	+	Dextrines	-
. Saccharose	+		

La fermentation se fait industriellement en cuve profonde avec aération par barbotage d'air pulsé stérile. Lorsque l'opération est terminée, le bouillon est filtré sur terre d'infusoire de façon à éliminer les bactéries et les corps solides.

L'extraction de l'antibiotique du filtrat est effectuée selon plusieurs modalités : adsorption, fixation sur résine échangeuse d'ions, extraction par solvant, sont utilisées seules ou ensemble, pour purifier l'antibiotique.

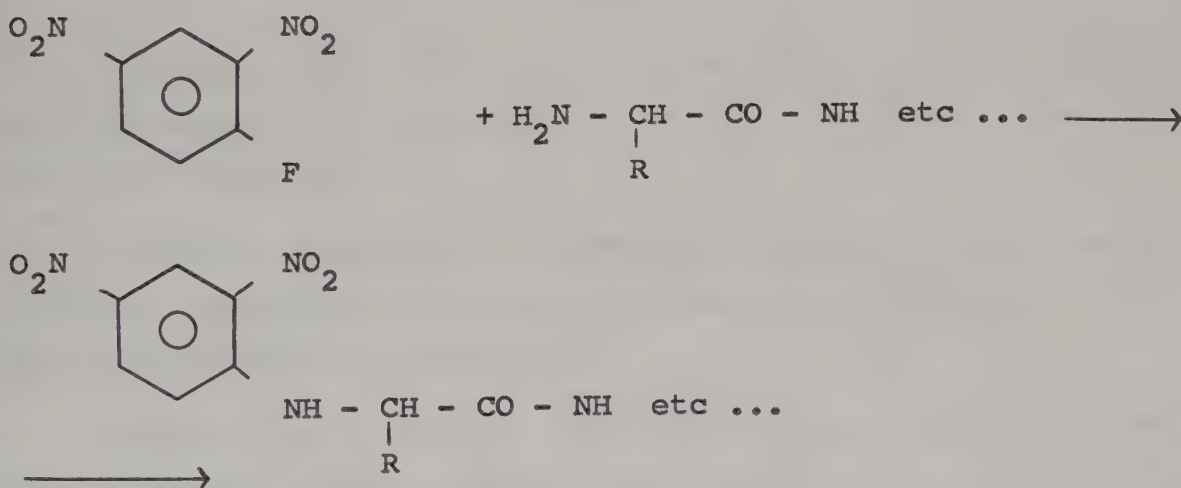
Dans la phase de biosynthèse de l'antibiotique, le laboratoire de contrôle doit suivre de façon continue le pH, l'augmentation de la concentration en antibiotique du bouillon, et surtout la non-contamination de ce dernier. Un bouillon contaminé par un autre germe au cours de la biosynthèse est un bouillon condamné à la destruction. Une diminution très forte du pH est l'indice d'une contamination microbienne toujours confirmée par la recherche bactériologique du germe.

Détermination de la structure des Polymyxines :

Depuis une vingtaine d'années, la structure de la plupart des antibiotiques polypeptidiques a été élucidée.

L'emploi systématique des dérivés 2 - 4 dinitrophényles pour identifier les acides aminés terminaux des séquences peptidiques et les techniques d'hydrolyse partielle introduites par SANGER, ont été largement utilisées.

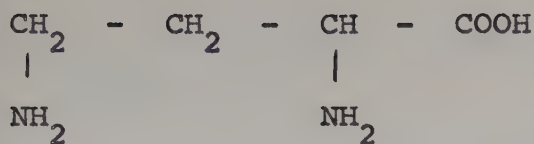
L'opération consiste à condenser le groupement α -NH₂ libre avec le dinitrofluorobenzène selon la réaction :



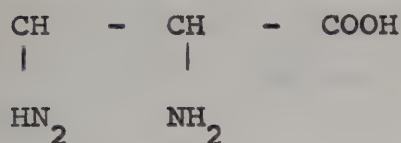
La purification des polypeptides et de leurs produits d'hydrolyse a été faite par séparation à contre-courant telle qu'elle est décrite par CRAIG, (35) (36) (55) ; l'identification des acides aminés a été effectuée par chromatographie de partage sur papier.

D'autre part, l'introduction récente des résines échangeuses d'ions a permis de réaliser de nombreuses séparations, en parallèle avec de nombreuses dialyses.

Un point particulier doit être mentionné, car il différencie ce type de polypeptides d'autres polypeptides biologiques, comme les hormones : la présence d'acides aminés inhabituels, tels que l'acide α γ diaminobutyrique et l'acide α β diaminopropionique et d'acides gras saturés, tel que l'acide méthyl octanoïque.



Acide $\alpha \gamma$ Diaminobutyrique.

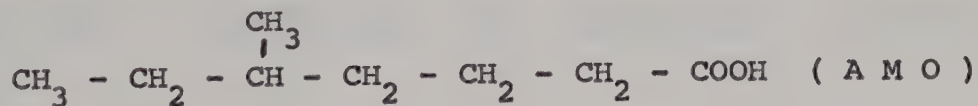


Acide α / β Diaminopropionique.

Souvent, comme beaucoup d'autres produits synthétisés par les microorganismes, ils contiennent, en plus des acides l-aminés, un acide d-aminé inhabituel.

L'examen des produits d'hydrolyse acide de toutes ces Polymyxines montre l'existence d'un acide aliphatique optiquement actif, en plus des acides aminés constitutifs.

Sauf dans le cas de la Polymyxine B₂ qui contient un acide isoctanoïque, l'acide trouvé a été l'acide (+) - 6 méthyloctanoïque (A M O) et sa structure, établie par WILKINSON (113), a été confirmée par synthèse (106).



(6)

Les Polymyxines diffèrent les unes des autres, aussi bien quantitativement que qualitativement, par leur composition en acides aminés.

La structure de la Polymyxine B a été élucidée par HAUSMANN et CRAIG (55) d'une part, et par BISERTE et DAUTREVAUX, d'autre part (12).

L'étude de la synthèse des Polymyxines a été réalisée par VOGLER (105).

Leurs masses moléculaires sont de l'ordre de 1150 - 1250 (40) et la nature cyclique de leurs structures explique l'absence de fonctions carboxyliques libres ainsi que de fonctions α aminées libres. (Tableau III).

ACIDES AMINES		POLYMYXINES							
		A	B ₁	B ₂	C	D	E	M	P
Ac. L	Diaminobutyrique	+	+	+	+	+	+	+	+
L	Thréonine	+	+	+	+	+	+	+	+
L	Leucine		+	+			+		
L	Phenylalanine				+				+
Ac. D	Diaminobutyrique	+							
D	Leucine	+				+	+	+	
D	Phenylalanine		+	+					
D	Serine					+			

TABLEAU III : COMPOSITION DES POLYMYXINES EN ACIDES AMINES

Ce tableau montre que la Polymyxine B est constituée par un mélange de deux Polymyxines B₁ et B₂ (55).

C'est à la Polymyxine B que nous nous attacherons plus particulièrement.

L'étude de la structure (Tableau I) montre que 5 radicaux basiques libres ($5-NH_2$) proviennent des groupes γ aminés des restes de l'acide $\alpha \gamma$ diaminobutyrique.

L'expérience nous a montré que le produit commercial ne présente pas la rigueur stoechiométrique du Tableau I, mais est formé d'un mélange de Polypeptides à action antibiotique Polymyxine B, avec en particulier, un mélange de Polymyxine B_1 et B_2 .

La différence entre Polymyxine B_1 et B_2 se tient dans la nature de l'acide aliphatique lié à la molécule; il s'agit de l'acide isoctanoïque pour la Polymyxine B_2 , alors que dans le cas de la Polymyxine B_1 , il s'agit de l'acide + 6 méthyloctanoïque. La constitution en acides aminés est exactement semblable, or, la modification moléculaire que nous allons réaliser ne touche que les groupements aminés libres, non α aminés, provenant donc d'acides aminés alcalins.

Activité antimicrobienne des Polymyxines :

Elles sont actives in vitro et in vivo sur presque tous les types de bacilles Gram négatifs (à l'exception du Proteus), (5) (13) (19) (24) (25) (43) (48) (49) (64) (66) (67) (71) (76) (77) (79) (89) (92) (107), mais n'ont que très peu d'effet sur les germes Gram positifs et coccipathogènes Gram négatifs.

La Polymyxine B a une action bactéricide. Elle semble agir par altération de la perméabilité de la membrane cellulaire de la bactérie, perturbant de cette façon son équilibre osmotique (41) (58) (72) (80) (81) (93).

Cette action est contrebalancée par les ions magnésium et on a pensé que son peu d'activité sur les bacilles Gram positifs était due au revêtement de ribonucléate de magnésium de ces microorganismes (44).

Déjà, en 1944, HOTCHKISS (58) montra que la Tyrocidine agissait sur les bactéries en bloquant les échanges de la même façon que certains détergents. Mais la Tyrocidine est trop toxique pour être d'un usage clinique courant et elle peut être remplacée par la Polymyxine B qui n'est pas absolument atoxique, comme nous allons le voir.

En 1956, A. NEWTON (80) (81) montra en utilisant une forme fluorescente de Polymyxine que celle-ci se fixait sur les membranes de nature lipoprotéïques des bactéries.

La Polymyxine est très largement utilisée par voie externe et même par voie orale. En effet, elle ne pénètre pas dans l'organisme et reste dans l'intestin en agissant in situ sur les germes Gram négatifs sensibles.

La voie parentérale est utilisée mais la Polymyxine B présente une grave néphrotoxicité, ce qui en limite l'emploi.

La toxicité de la Polymyxine se traduit par une libération d'histamine, à tel point que l'on utilise ce produit comme histamino-libérateur dans des études de pharmacologie, (23) (34) (53) (54) (95) (110).

La libération d'histamine semble due aux radicaux NH_2 libres et de nombreuses publications étudient la formation de dérivés méthanesulfoniques destinés à diminuer la toxicité des produits basiques (7) (16).

C'est la raison pour laquelle nous avons essayé de réaliser de tels produits sur la Polymyxine B commerciale.

II . L E S D E R I V E S M E T H Y L S U L F O N I Q U E S : =====

- . METHANE SULFONATE DE POLYMYXINE B (M. S. P.)
- . ACIDE POLYMYXINE METHYLENE SULFONIQUE (A. P. M. S.)

Hypothèse sur la structure :

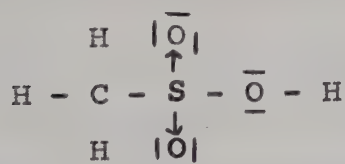
Les processus chimiques de transformation que nous avons fait subir à la molécule ont pour but de former un Polyacide Méthane Sulfonique de Polymyxine.

Les cinq fonctions aminées libres - NH_2 seront transformées en radicaux - $\text{NH} - \text{CH}_2 - \text{SO}_3\text{H}$.

La nomenclature classique parle de Méthane Sulfonate de Polymyxine, ce qui laisserait entendre que l'on a affaire à un sel de Polymyxine et d'Acide Méthane Sulfonique. En réalité, il s'agit d'un dérivé Méthane Sulfonique de la Polymyxine :

L' Acide Méthane Sulfonique (114),

$\text{CH}_3 - \text{SO}_3\text{H}$ qui présente la structure électronique suivante, où le soufre du radical - SO_3H est directement lié au carbone du radical Méthyle :

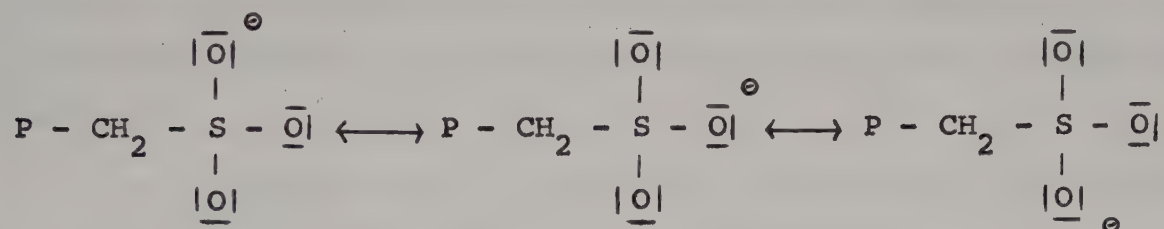


Les autres liaisons sont constituées par deux liaisons semi-polaires avec deux oxygènes et une liaison covalente ordinaire avec l'oxhydryle.

Les dérivés sont formés en remplaçant un hydrogène du chaînon méthylé par un radical : celui-ci est lié à la fonction sulfonique

par un chaînon méthylénique, d'où l'appellation d'Acide Polymyxine Méthylène Sulfonique, (A.P.M.S), pour les dérivés que nous avons ainsi obtenus.

Le groupement sulfonique terminal est stabilisé par effet de mésométrie symétrique (114).



L'examen schématisé du procédé de préparation de ces dérivés nous permet d'étudier toutes les possibilités de liaisons.

Dans la pratique, ces dérivés sont formés en mélangeant la Polymyxine en solution, le Formaldéhyde et de l'Acide sulfureux ou du Sulfite acide de sodium (7).

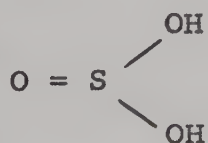
Dans un premier temps, nous retrouvons l'action d'un aldéhyde sur une amine primaire, (formation de base de SCHIFF) :



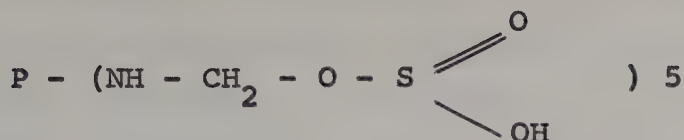
avec formation transitoire d'un alcool qui se déshydrate.

Dans le cas de la Polymyxine, la déshydratation ne se produit pas ; la structure de la molécule de Polymyxine stabilisant l'alcool, on obtient un dérivé méthylolé.

Il serait légitime d'admettre que l'action de l'acide sulfureux :



donne naissance à un ester de l'acide sulfureux :



qui, par hydrolyse alcaline redonne l'alcool correspondant ; or, il n'en est rien et seule l'hydrolyse acide est susceptible de régénérer Polymyxine, Méthanal et Acide sulfureux sous forme d'anhydride sulfureux.

Ceci corrobore bien l'hypothèse de formation d'un dérivé de l'Acide méthane sulfonique, avec l'enchaînement :



dans lequel le soufre est directement lié au carbone.

La tentative d'interprétation de la réaction nous a amené à envisager la structure électronique des radicaux touchés.

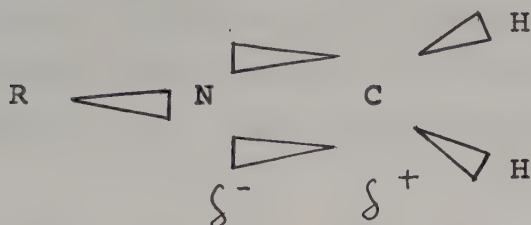
Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

Hypothèse fondée sur la nature des liaisons :

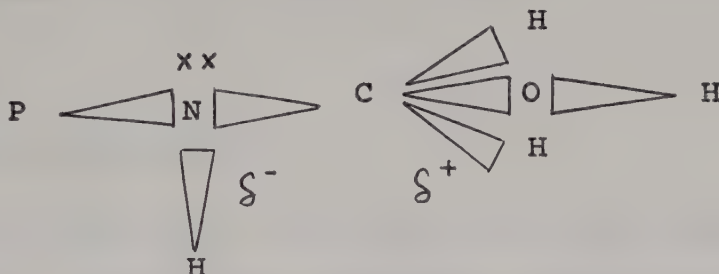
Les liaisons entre atomes ayant une affinité électronique inégale sont polarisées, c'est-à-dire dissymétriques du point de vue électrique. La paire d'électrons commune sera attirée d'une manière prépondérante par les éléments les plus électronégatifs.

On a montré également que la dissymétrie électrique provoquée par de tels "atomes clefs" n'est pas limitée à la liaison entre cet atome clef et l'atome voisin mais qu'elle s'étend plus loin au sein de la molécule, de telle sorte que les liaisons les plus proches sont induites et par suite polarisées, même si en elles-mêmes elles sont symétriques (39).

L'action du formaldéhyde sur la fonction amine primaire donnant un dérivé méthylénique dans lequel l'azote a le rôle d'atome clef, l'octet du carbone est relâché et le "crypto ion" formé présente un carbone méthylénique ayant une polarité positive, (δ^+)

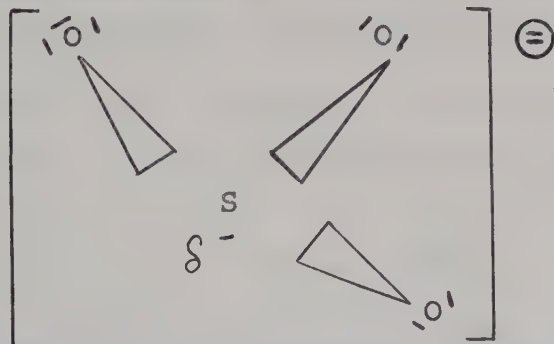


En présence du dérivé méthylolique, comme c'est le cas pour la Polymyxine, nous aurons la formule :



La polarité positive du carbone méthylénique est renforcée en raison de la présence du 2ème atome clef : l'oxygène.

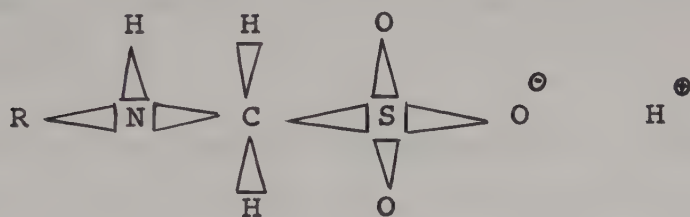
L'acide sulfureux mis en présence a la structure électronique suivante :



Le noyau du soufre, extrêmement électro-négatif aura donc une cryptocharge négative δ^- et l'ion vrai sulfureux ne sera qu'en relation d'ions avec des ions hydrogène ou alcalins, selon le réactif utilisé.

En fonction de ces données, nous émettons l'hypothèse suivante :

Les polarités différentes permettent de comprendre le remaniement de la structure électronique du produit, la charge positive cryptoionique du carbone et celle négative cryptoionique du soufre, expliquent l'attraction de ces deux éléments. Dans ce nouveau corps, le carbone méthylénique se fixera directement au soufre, en donnant naissance à un radical méthylsulfonique très acide.



Hypothèses analogiques :

Pour notre part, nous avons également envisagé l'hypothèse de formation de ce composé selon une réaction analogue à celle de MANNICH (73) (75) (103).

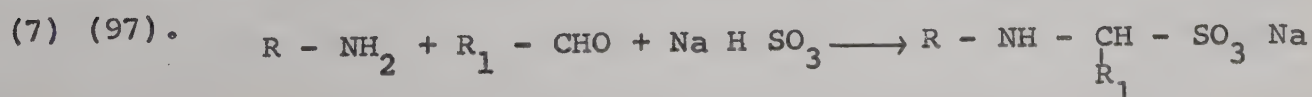
Rappelons que cette réaction est fondée sur la condensation de composé à hydrogènes mobiles avec une amine primaire en présence de formaldéhyde aboutissant à la formation d'un pont méthylénique

Nous pouvons alors considérer que le donneur d'hydrogène est l'acide sulfureux, l'amine primaire étant la Polymyxine.



Un autre processus décrit couramment, fait intervenir la réaction signalée par SCHIFF en 1866, mais n'est pas en fait, foncièrement différent des précédents.

La réaction d'une amine primaire avec un aldéhyde et du sulfite de sodium convertit des substances basiques en acides sulfoniques,



II - METHODE CLASSIQUE DE PREPARATION DES DERIVES METHYLSULFONIQUES

=====

Les méthodes classiques qui sont décrites dans un certain nombre de brevets de fabrication (3) (102) (109), permettent d'obtenir des produits de valeur variable, comme nous le verrons par la suite.

Sans entrer ici dans le détail des procédés décrits, il convient seulement de préciser que la semi-synthèse se déroule en deux étapes principales :

. Réaction du sel de Polymyxine avec le Formaldéhyde dans des conditions bien déterminées (pH de 6,6 à 6,8 environ), aboutissant quelles que soient les modalités pratiques à l'obtention du dérivé méthylol :



P - reste de Polymyxine.

. Préparation du dérivé sulfométhylé selon la réaction :



Dérivé sulfométhylé de Polymyxine.

De nombreux facteurs interfèrent sur la formation de ce produit.

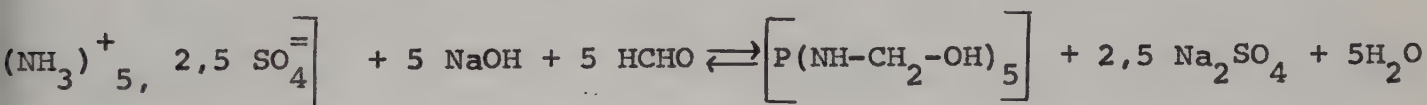
En premier lieu, nous sommes en présence de deux réactions d'équilibre, régies par la loi d'action de masse et il sera nécessaire de faire en sorte que la réaction soit la plus complète possible.

En deuxième lieu, il faudra que la substitution des cinq fonctions aminées libres soit complète, or, nous savons par l'expérience que le produit commercial sur lequel nous avons travaillé est un mélange des deux Polymyxines et d'une petite quantité d'impuretés polypeptidiques.

Les trois procédés principaux peuvent être schématisés de la façon suivante :

PROCEDE 1

Formation de Méthylolpolymyxine selon la réaction :



L'addition des réactifs se fait dans les proportions stoechiométriques de 5 molécules de formol par molécule de Polymyxine sans tenir compte du pH.

Le méthylol est alors précipité par la soude à pH 8,5.

Après lavage, ce produit est dissous dans une solution de bisulfite à température de 50 - 55°C. Cette solution filtrée, décolorée, est alors desséchée sous vide à basse température.

PROCEDE 2

Il diffère du précédent en ce sens que la première phase réactionnelle se fait en solution tampon bicarbonate/carbonate de sodium, à pH 8,5.

La réaction se stabilisant à pH 6,5 fournit directement un précipité et une mousse abondante, comme nous avons pu le vérifier nous-même.

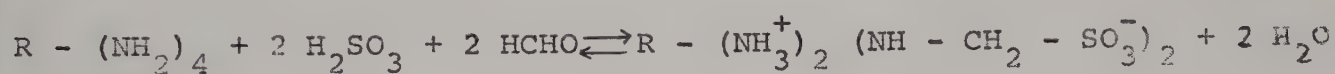
Au deuxième stade, c'est cette fois-ci la proportion de bisulfite qui est fixée dans la proportion de 1,2 équivalent-gramme du dérivé méthylol. La suite de la réaction est la même.

PROCEDE 3

Il a été décrit en particulier pour les Kanamycines (Tableau IV), mais peut s'appliquer à toutes les bases organiques comme la Polymyxine B.

Dans ce cas, c'est directement un mélange de Formaldéhyde et de Bisulfite ou Hydroxyméthanesulfonate qui entre en réaction avec les fonctions aminées libres en donnant le dérivé méthylsulfonique.

Ce brevet (102) prévoit aussi de former d'abord un sulfite de la base par action de l'acide sulfureux, puis un sel interne d'un dérivé méthylsulfonique semi-substitué.



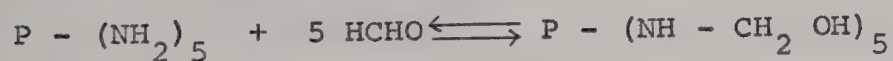
Kanamycine

Kanamycine méthylsulfonate interne

Remarques sur les divers procédés employés :

a - Premier stade

Le but de la réaction est d'obtenir un produit entièrement substitué (pentasubstitué) dans le cas de la Polymyxine.



Dans le premier procédé, l'emploi d'une quantité juste suffisante de formol ne permet pas d'obtenir une réaction complète et les produits mal substitués obtenus présentent des variations de toxicité qui en rendent l'utilisation difficile. Nous avons vérifié ce fait au cours de notre étude analytique.

Le deuxième procédé nous semble meilleur puisque l'addition du méthanal à la solution de Polymyxine se fait à un pH tamponné qui est déjà celui de la précipitation.

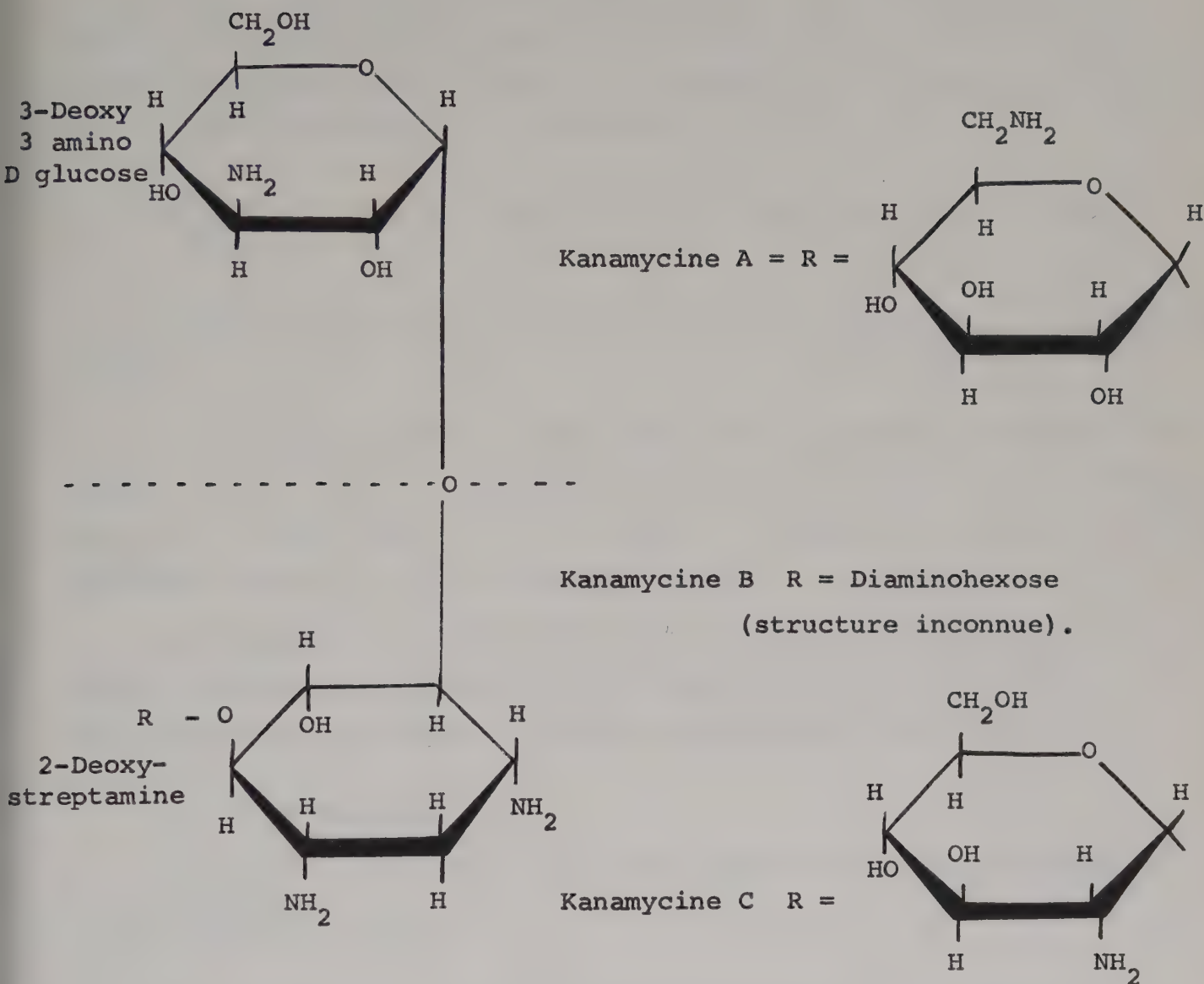
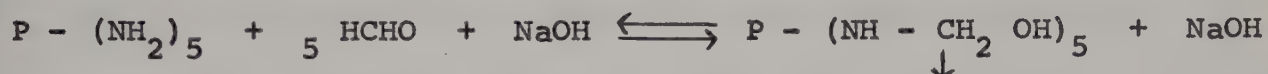


TABLEAU IV : STRUCTURE DES KANAMYCINES (88) selon RINEHART, WOO,
ARGOUDELIS et GIESBRECH - (J.Am.Chem.Soc. 79 - 4567 (1957))

La structure de la Kanamycine foncièrement différente de celle de la Polymyxine, présente bien 4 fonctions aminées susceptibles de réagir selon le protocole décrit.

Encore conviendrait-il de définir parmi les cinq dérivés de substitutions minimales lequel est le plus stable, cependant, nous pouvons remarquer que du fait de la précipitation l'équilibre est déplacé vers la formation du méthylol.



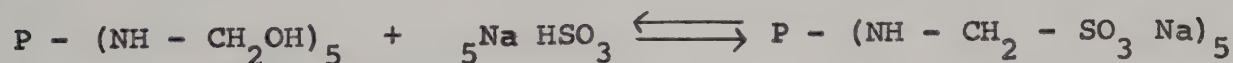
La soude n'intervient donc que pour neutraliser l'acide sulfurique libéré.

Le troisième procédé faisant agir, pour sa partie originale, le formol sur une solution bisulfitée de l'antibiotique, ne donne ainsi que nous l'avons constaté qu'un méthane sulfonate semi-substitué, aussi avons-nous écarté cette technique.

Notre expérience personnelle nous a montré après de nombreux essais réalisés que le stade de la méthylolation est le stade le plus important qui régit une bonne substitution du produit final.

b - Deuxième stade

Au cours du deuxième stade, nous sommes de nouveau en présence d'une réaction d'équilibre.



Il est donc nécessaire pour obtenir une réaction complète vers la droite, d'employer un excès de Sulfite acide de sodium.

Selon les divers procédés, cet excès variable de Sulfite acide de sodium restant obligatoirement au cours de la dessiccation finale dans le produit fini, apportait avec un titre incertain, une toxicité variable et un résidu minéral important à la calcination.

Ayant le souci d'obtenir un produit dépourvu de sulfites en excès et conscient de la nécessité absolue de travailler en présence d'un excès de réactif, nous avons cherché un moyen d'éliminer cet excès au cours de la dernière phase de la préparation. Nous avons ainsi mis au point un procédé personnel de fabrication.

Avant d'exposer celui-ci, nous allons décrire les diverses méthodes analytiques utilisées qui nous ont permis de suivre et d'explorer les diverses phases de cette hémisynthèse.

CHAPITRE 2 : ANALYSE CHIMIQUE DU DERIVE
ACIDE POLYMYXINE METHYLENE
SULFONIQUE (A. P. M. S.)

La détermination de la masse moléculaire de la Polymyxine B découle de la structure telle que nous l'avons décrite dans la première partie (40) (Tableau I) et se trouve être de $M = 1201$.

Comme il s'agit d'un sulfate ($2/5 H_2 SO_4$), nous aurons :

$$1201 + 245 = 1446.$$

En tenant compte d'une substitution maximale pour la Polymyxine B c'est-à-dire 5, la masse moléculaire deviendra 1671.

Dans ces conditions, la teneur théorique en soufre doit être égale à 9,57 p 100. Au cours de l'hydrolyse acide, la molécule doit libérer 19,14 p 100 de SO_2 .

Le titre biologique du nouveau produit que nous définirons dans le chapitre suivant, doit être théoriquement identique au titre de la Polymyxine initial, multiplié par le coefficient :

$$k = \frac{\text{Masse moléculaire Polymyxine B Sulfate}}{\text{Masse moléculaire A. P. M. S.}} = \frac{1446}{1650} = 0,88.$$

Cependant, les traitements thermiques subis par la Polymyxine ne permettent pas un "rendement" d'activité parfait, et le titre obtenu oscille entre 5000 et 6500 environ, (il s'agit évidemment de titre microbiologique).

Nous avons groupé dans le Tableau V, les résultats obtenus sur différents essais réalisés. Le dosage du titre actif a été réalisé par voie microbiologique sur *Bordetella bronchiseptica*, selon la technique qui sera décrite plus loin dans l'analyse biologique du produit.

Seuls les résultats des essais réalisés par voie biologique donnent une idée de la perte d'activité du produit après sulfonation.

Les dosages chimiques proposés (63) ne sont pas spécifiques.

Comme nous le verrons plus loin, le taux de SO_2 garantit une bonne substitution et est en relation étroite avec la toxicité de l' A.P.M.S..

Lorsque la toxicité du produit est satisfaisante, ce taux de SO_2 est convenable et c'est lui que nous avons utilisé pour suivre l'amélioration des techniques de fabrication.

Nous avons alors réalisé l'analyse élémentaire de ces produits, en ce qui concernait le Soufre, l'Anhydride sulfureux libre, l' Anhydride sulfureux lié et les cendres.

ESSAIS	TITRE POLYMYXINE B U.I/mg	TITRE THEORIQUE A OBTENIR U.I/mg	TITRE A. P. M. S. OBTENU U.I/mg
1	7 500	6 600	5 400
2	7 400	6 510	6 000
3	7 500	6 600	5 735
4	7 500	6 600	5 375
5	7 400	6 520	5 100
6	7 400	6 510	6 000
ST ₂	7 400	6 510	5 400
ST ₃	7 500	6 600	5 713
3260 1	7 450	6 552	6 220
2	7 450	6 552	5 378
3	7 450	6 552	5 701
4	7 450	6 552	6 015
Lot 50 594	7 440	6 550	5 440
Lot 82 399	6 750	5 940	5 150
3069 1	7 500	6 600	6 053
2	7 500	6 600	5 897
3	7 500	6 600	5 719
4	7 500	6 600	5 525
P.C.A.S.	7 450	6 552	5 635
P.C.A.S.	7 450	6 552	5 613
P.C.A.S.	7 450	6 552	5 684

TABLEAU V : TITRES BIOLOGIQUES COMPARES DU SULFATE DE POLYMYXINE B ET
DE L'A.P.M.S. CORRESPONDANT EXPRIMES EN U.I DE POLYMYXINE B PAR mg.

DOSAGE DU SOUFRE

La méthode utilisée pour la détermination du soufre a été la minéralisation dans l'oxygène selon SCHONIGER telle qu'elle est décrite à la Pharmacopée française 1965 p 1563. Toutefois, nous avons terminé le dosage par gravimétrie du Sulfate de Baryum selon le procédé classique : précipitation à l'ébullition, filtration, lavage, calcination et pesée.

DOSAGE DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX

Libre :

L'anhydride sulfureux libre est entraîné par la vapeur d'eau et l'anhydride sulfureux est dosé dans le liquide d'entraînement par iodométrie.

Total :

En milieu acide, l'anhydride sulfureux est libéré de l'A.P.M.S. et entraîné par la vapeur d'eau. Il est dosé dans le distillat par iodométrie.

Le Tableau VI donne les principaux résultats.

L'ensemble des résultats obtenus se trouve dans la fourchette des normes suivantes :

. Soufre total	8,5 à 11,5 p 100
. SO ₂ libre	< 0,1 p 100
. SO ₂ total	16 à 21 p 100
. Cendres sulfuriques	< 1,0 p 100
. Perte à la dessiccation (2 h 56°C sous vide < 5 mm Hg)	< 5,0 p 100
. Métaux lourds	< 50 p.p.m

LOTS	SOUFRE TOTAL %	ANHYDRIDE SULFUREUX COMBINE %	ANHYDRIDE SULFUREUX LIBRE %	CENDRES SULFURIQUES %	PERTE A LA DESSICATION %
THEORIE	9,690	19,400	< 0,100	< 1,000	2 h à 56°C Sous vide < 5,000
ST ₂	11,200	20,130	0,020	0,600	3,000
3069 ₁	9,250	18,860	0,024	0,000	2,830
2	10,030	18,680	0,100	0,195	1,280
3	9,680	20,080	0,023	0,097	1,640
4	9,560	19,780	0,016	0,000	1,610
ST ₃	10,500	-	-	-	-

TABLEAU VI : RESULTATS CHIMIQUES CONCERNANT QUELQUES LOTS D' A.P.M.S.

S P E C T R E S I N F R A - R O U G E S

=====

Afin de parfaire l'analyse de l' A.P.M.S. et pour l'identifier d'une manière plus précise, nous avons réalisé des spectres I-R.

L'ouvrage de GROVE et RANDALL (51) renferme une série de tableaux se rapportant aux spectres d'absorption dans l'infra-rouge d'antibiotiques et en particulier, celui du Sulfate de Polymyxine (en pastilles de K Br).

GORE (47) a également étudié ces spectres.

Pour notre part, nous avons étudié parallèlement les spectres du Sulfate de Polymyxine B et de son dérivé méthylsulfonique.

Mode opératoire :

. Mélanger au mortier d'agate 4 mg d' A.P.M.S. avec 250 mg de Bromure de potassium spécial pour spectrophotométrie infra-rouge.

. Après broyage et malaxage, les particules du produit à tester ont une taille inférieure à 2μ (22).

. Placer le mélange dans un moule et presser au moyen d'une presse hydraulique (Research and Industrial Instruments Company England). Sous une pression de 13 tonnes au cm^2 le Bromure de potassium se comprime en un solide homogène et transparent aux rayons infra-rouges.

. Déterminer ensuite l'absorption dans l'infra-rouge entre 2 et 15μ . L'enregistrement du spectre a été fait sur un appareil Perkin-Elmer.

Résultats obtenus :

Le spectre du dérivé méthylsulfonique présente deux bandes à 1040 cm^{-1} et à 1220 cm^{-1} qui ne sont pas retrouvées dans le spectre du Sulfate de Polymyxine.

En nous référant aux ouvrages de BELLAMY (9) et de A.D. CROSS (37), nous constatons que ces bandes correspondent au radical sulfonique.

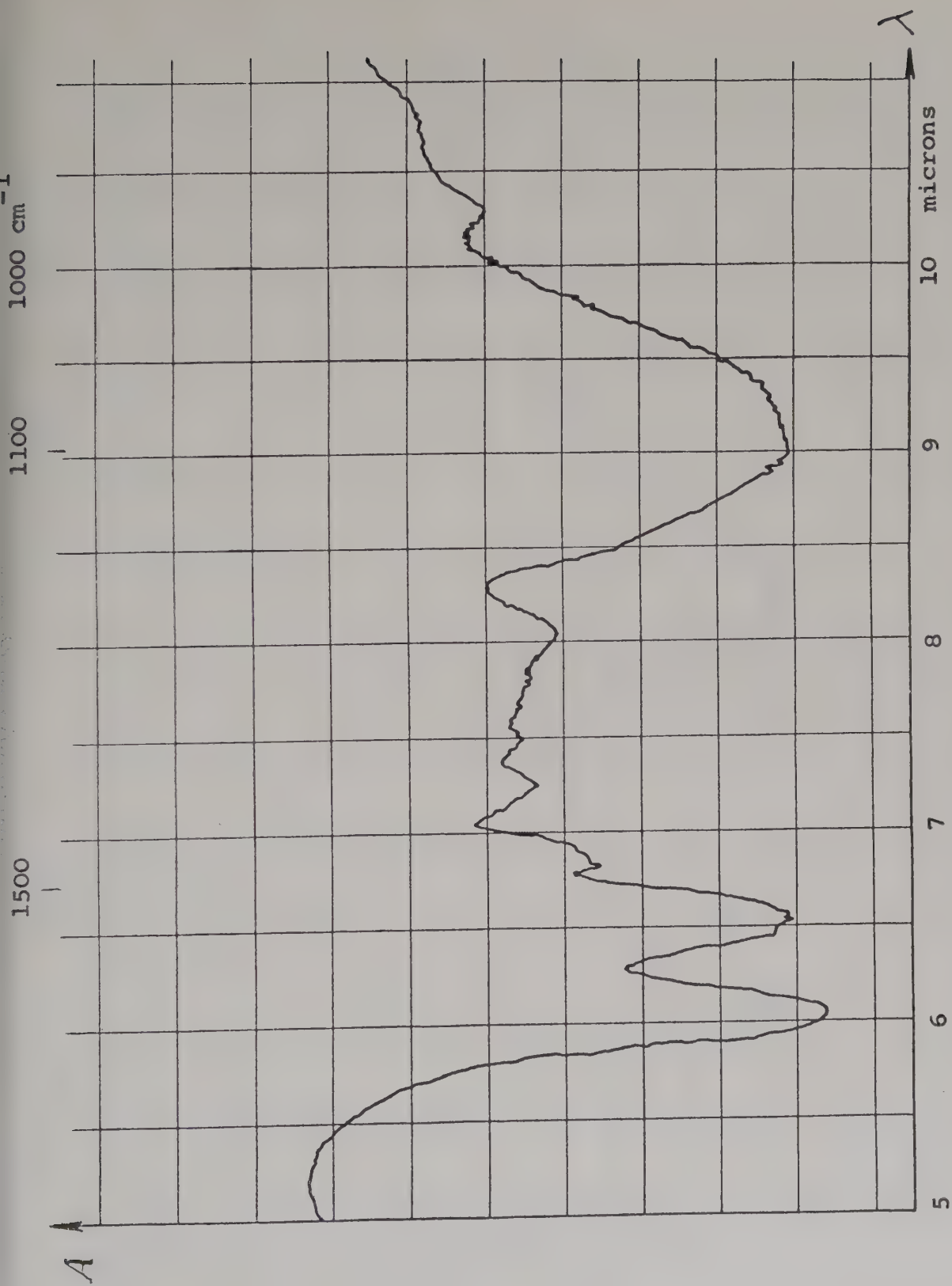


TABLEAU VII : SPECTRE I-R DE POLYMYXINE B

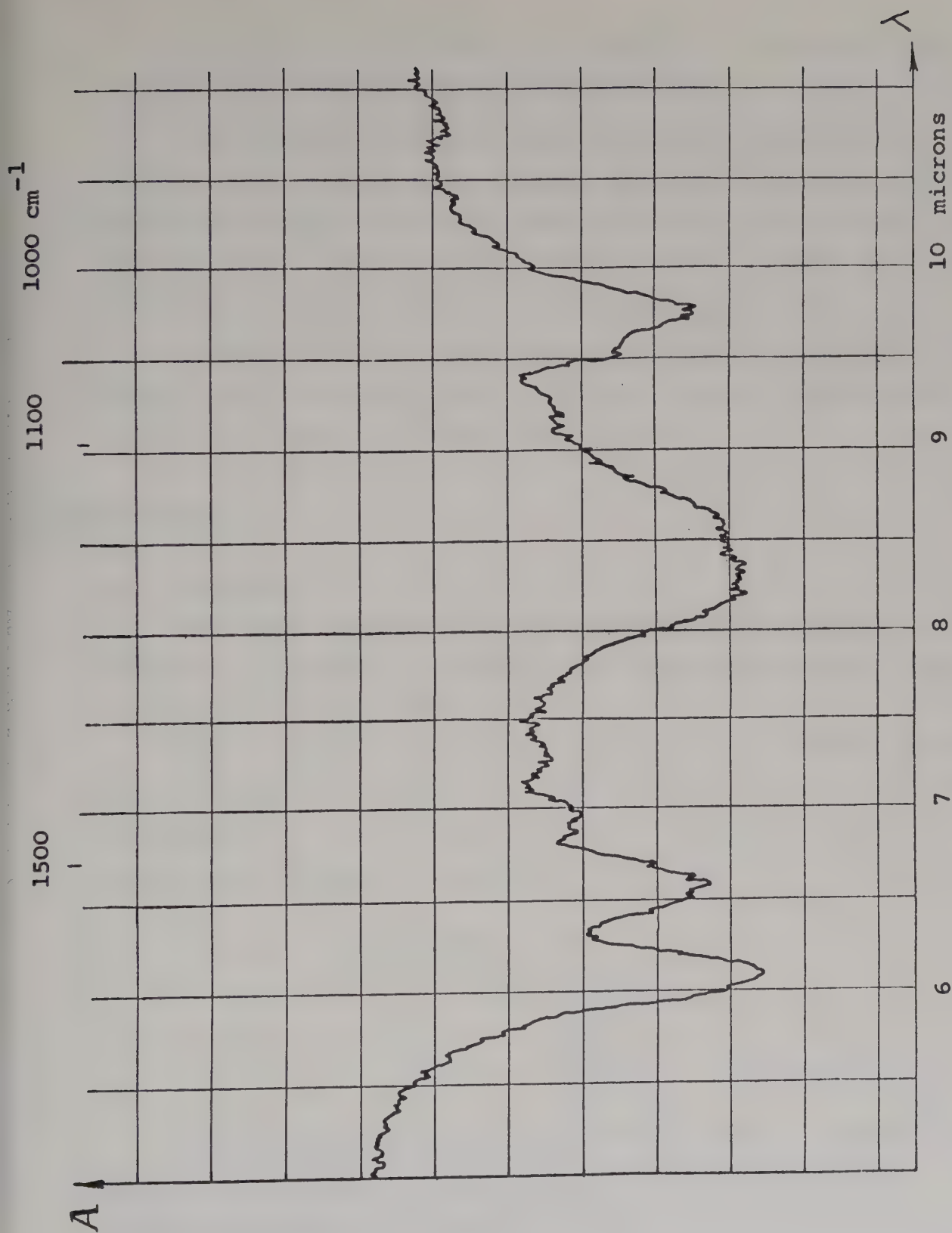


TABLEAU VIII : SPECTRE I.R. D' A. P. M. S.

Le spectre infra-rouge est un procédé d'identification. Il ne permet pas de vérifier que le corps est pur.

L' A.P.M.S. présente un titre biologique supérieur à 5 000 U.I / mg. Si le titre obtenu dépasse le titre initial de la Polymyxine matière première, multiplié par le coefficient 0,88, nous pourrions avoir une présomption d'un A.P.M.S. pollué par de la Polymyxine ou des dérivés incomplètement substitués.

Il faut considérer également que l'analyse biologique est une méthode peu précise et que la matière première commerciale n'est jamais d'une pureté chimique très grande.

CHROMATOGRAPHIE

Sur papier

Nous avons pensé que la chromatographie sur papier permettrait d'étudier la pureté et d'identifier les corps obtenus. Diverses techniques ont été préconisées.

NASH et SMASHEY (78) utilisent un papier imprégné de tampon et comme solvant, le butanol acétique. D'autres auteurs emploient les mêmes solvants et un tampon glycine 0,2 M amené à pH 2,5 par HCl. Ils donnent les valeurs suivantes de Rf :

POLYMYXINES	Rf
A	0,18
D	0,38
E	0,54
B	0,56

Cette méthode présente l'inconvénient de mal séparer les dérivés sulfoniques des antibiotiques bases et ne permet pas une différenciation des Polymyxines E et B.

Méthode de la Pharmacopée européenne

Nous avons recherché systématiquement des techniques permettant la séparation des polypeptides en général, et en particulier, des différentes Polymyxines, car il nous semblait important de pouvoir différencier par exemple, l' A.P.M.S. du Colimycine méthane sulfonate et la Polymyxine de la Colimycine ou Polymyxine E.

Ces deux antibiotiques ne diffèrent entre eux que par la nature d'un acide aminé. Ils sont donc très difficiles à séparer. La Polymyxine E contient de la D. Leucine alors que la Polymyxine B n'en contient pas ; de plus, la Polymyxine B ou du moins les Polymyxines B₁ et B₂ contiennent de la D - Phenylalanine alors que la Polymyxine E n'en contient pas (40).

Cette difficulté de séparation a conduit divers auteurs à réaliser une hydrolyse de ces produits et à caractériser les acides aminés (59). La British Pharmacopoeia 1968 et maintenant la Pharmacopée européenne, ont repris cette technique dans les identifications de la Polymyxine B.

Elle consiste à effectuer une hydrolyse acide du produit en tube scellé, pendant 5 h à 135°C et après évaporation au bain-marie, à chauffer le résidu et à maintenir le chauffage jusqu'à élimination de toute odeur d' HCl. Le résidu est ensuite dissous dans l'eau et soumis à une chromatographie sur papier en comparaison avec des étalons Leucine, Phenylalanine, Thréonine et Serine. Le solvant employé est un mélange alcool butylique tertiaire / méthanol / eau, dans les proportions de 4 / 5 / 1 . Le développement du chromatogramme dure 6 heures.

Sur couches minces

Nous avons donc recherché une technique de séparation et d'identification des Polymyxines et de leurs dérivés méthylsulfoniques, plus simple et plus rapide.

- Méthode de la note Pro Pharmacopoea N° 18

Nous avons appliqué la méthode que nous avons proposée à la Commission de la Pharmacopée française et qui a été reproduite dans la note de Pro Pharmacopoea N° 18 consacrée au Sulfate de Polymyxine.

Le procédé est d'ailleurs applicable de façon générale pour la séparation et l'identification des antibiotiques basiques.

. Mode opératoire :

Solvant de cuve n-butanol/pyridine/acide acétique/eau (30/20/6/24).

Dépôt : 10 μ l de solution.

Révélateur : Ninhydrine.

. Résultats obtenus :

La séparation d'antibiotiques ou assimilés tels que Bacitracine, Polymyxine, Kanamycine et Tyrocidine est très bonne (Tableau IX).

La séparation A.P.M.S. - Polymyxine B est mauvaise (même Rf), (Tableau X).

- Méthode de IGLOY M. et MIZSEL A.

Ces deux auteurs ont étudié un procédé de séparation des Polypeptides (61) (62) par chromatographie sur couche mince. En ce qui concerne les Polymyxines, ils indiquent les Rf suivants :

POLYMYXINES	Rf
B	0,45
D	0,51
E	0,95
M	0,36

Ils ont constaté que la Polymyxine E présente à côté d'une tache principale de Rf 0,95 deux petites taches de Rf plus petits et actives biologiquement.

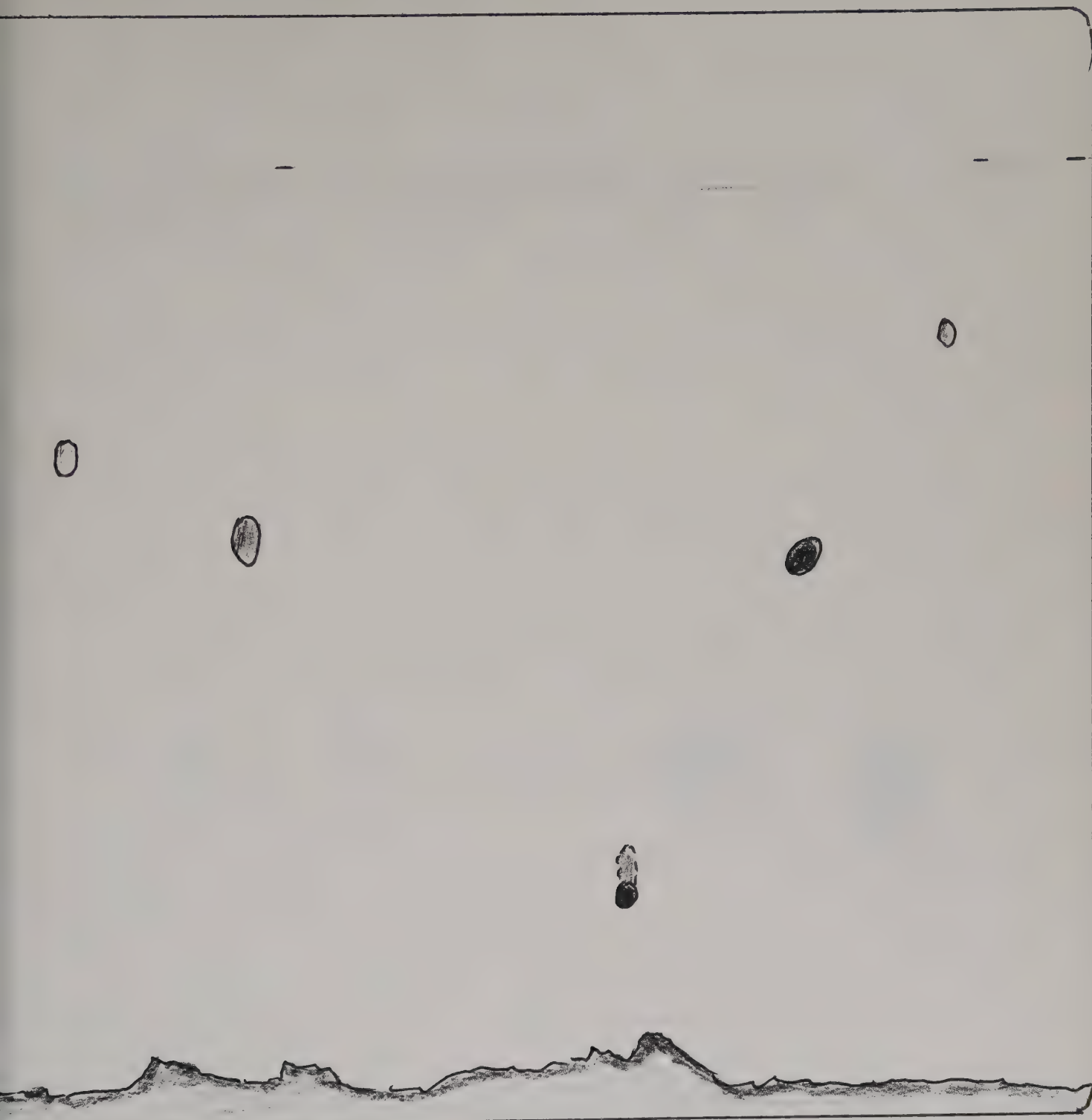


TABLEAU IX : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES DE QUELOUES
ANTIBIOTIQUES

B : Bacitracine
C : Colimycine
G : Gramicidine

K : Kanamycine
P : Polymyxine
T : Tyrocidine

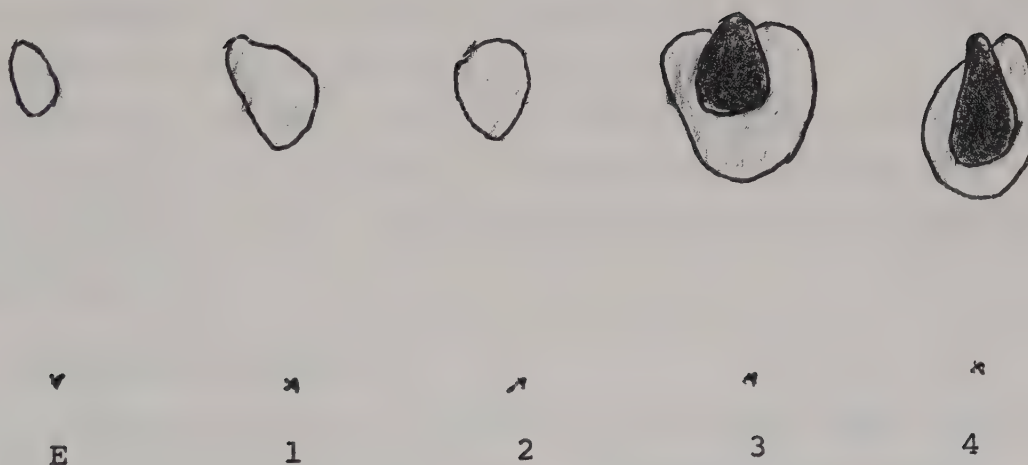


TABLEAU X : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES DE POLYMYXINE ET

D' APMS

E : Polymyxine étalon

Taches 1 et 2 : Polymyxine à concentrations différentes

Taches 3 et 4 : A.P.M.S. + Polymyxine.

Pour notre part, nous n'avons pas pu reproduire ces résultats en ce qui concerne la séparation Colimycine - Polymyxine B. En revanche, ce procédé permet de séparer parfaitement les dérivés méthylsulfoniques des polypeptides qui leur ont donné naissance, (Tableau XI).

Dans un article ultérieur (62), les mêmes auteurs ont reconnu avoir confondu la Colimycine et son dérivé méthylsulfonique.

Nous avons constaté en effet, que les flacons de soluté injectable de Colimycine renferment du méthane sulfonate de Colimycine.

. Mode opératoire :

Plaque de Silicagel G (e = 0,25 mm) - 30 g de Silicagel G + 60 ml d'eau.

Temps d'activation : 1/2 h à l'étuve à 110°C.

Solvant : Acétone/Eau/Acide acétique/Ammoniaque 2 N - 15/5/1/2/.

Déposer à 2 cm du bas de la plaque et à 3 cm l'une de l'autre 5 μ l de chacune des solutions aqueuses à 10 p 100 en séchant éventuellement dans un courant d'air chaud.

Développer pendant 1 h 30 à la température du laboratoire et après séchage, pulvériser sur la plaque une solution d'hydrate d'indanetrione (R) à 1 p 100 dans le n-butanol (R). Chauffer à 80°C pendant 5 à 10 mn.

. Résultats obtenus :

Le chromatogramme ne présente qu'une seule tache de Rf semblable à celui de la solution-étalon pour les Polymyxines-mères.

La première copie de chromatogramme montre la séparation parfaite de la Colimycine et de la Colimycine méthane sulfonate, (Tableau XI).

Nous retrouvons bien les deux petites taches annoncées pour la Polymyxine E ou Colimycine méthane sulfonate. Il s'agit donc de produits différemment substitués bien qu'actifs biologiquement, ce que nous retrouvons pour notre dérivé.

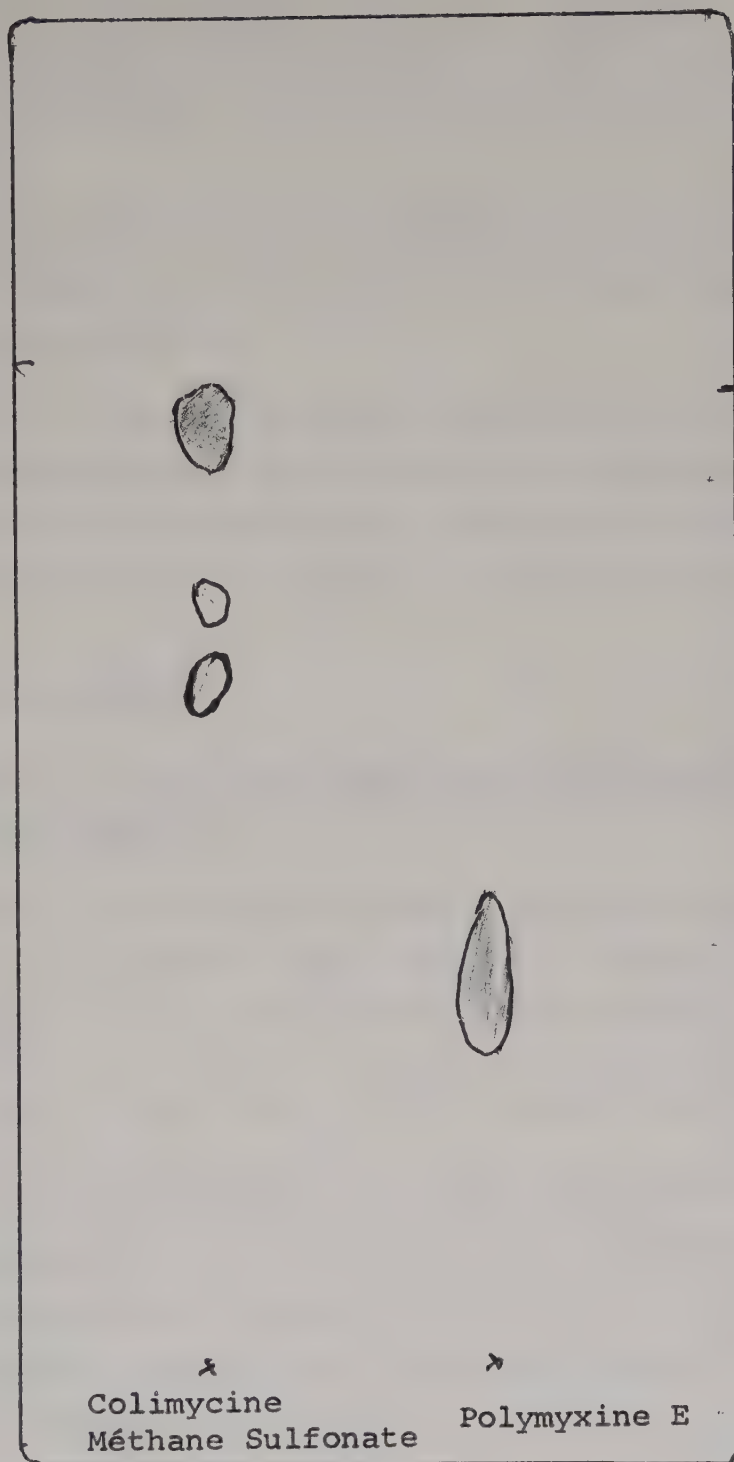


TABLEAU XI : SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DE LA POLYMYXINE E ET
DE SON METHANE SULFONATE.

La révélation par microbiologie (61) réalisée à l'Institut de Recherche de Chimie Pharmaceutique à Budapest, a montré que ces deux petites taches sont actives bactériologiquement sur *Bordetella bronchiseptica*.

La deuxième copie de chromatogramme nous montre que l'on sépare bien par ce procédé l' A.P.M.S. de l'antibiotique qui lui a donné naissance, (Tableau XII).

De nombreux lots contenant des produits incomplètement substitués montrent plusieurs taches correspondant à des intermédiaires de sulfonations. Cette technique s'est ainsi avérée satisfaisante pour suivre la production de l' A.P.M.S. au cours de la fabrication.

SEPARATION SUR RESINES

- Procédés de séparation fondés sur la différence de polarité des deux molécules :

Comme nous l'avons constaté dans la première partie, la Polymyxine B est un cation ; son dérivé l' A.P.M.S. est un anion, les terminaisons $-NH_2$, $-NH_3^+$ étant transformées en

$-NH-CH_2-SO_3H$, $-NH-CH_2-SO_3^-$ au cours de la réaction.

Il était donc intéressant d'employer les résines échangeuses d'ions. La séparation de la Polymyxine B de ses formes pharmaceutiques par résine échangeuse de cation a été décrite (utilisant l'Amberlite IRC 50) et devrait permettre une séparation complète des deux dérivés A.P.M.S. et Polymyxine (63).

ELECTROPHORESE SUR PAPIER

Afin de disposer d'un deuxième procédé qui permettrait de confirmer les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince, nous avons eu recours à l'électrophorèse sur papier.

Ces produits ayant des charges opposées doivent en effet se séparer facilement.

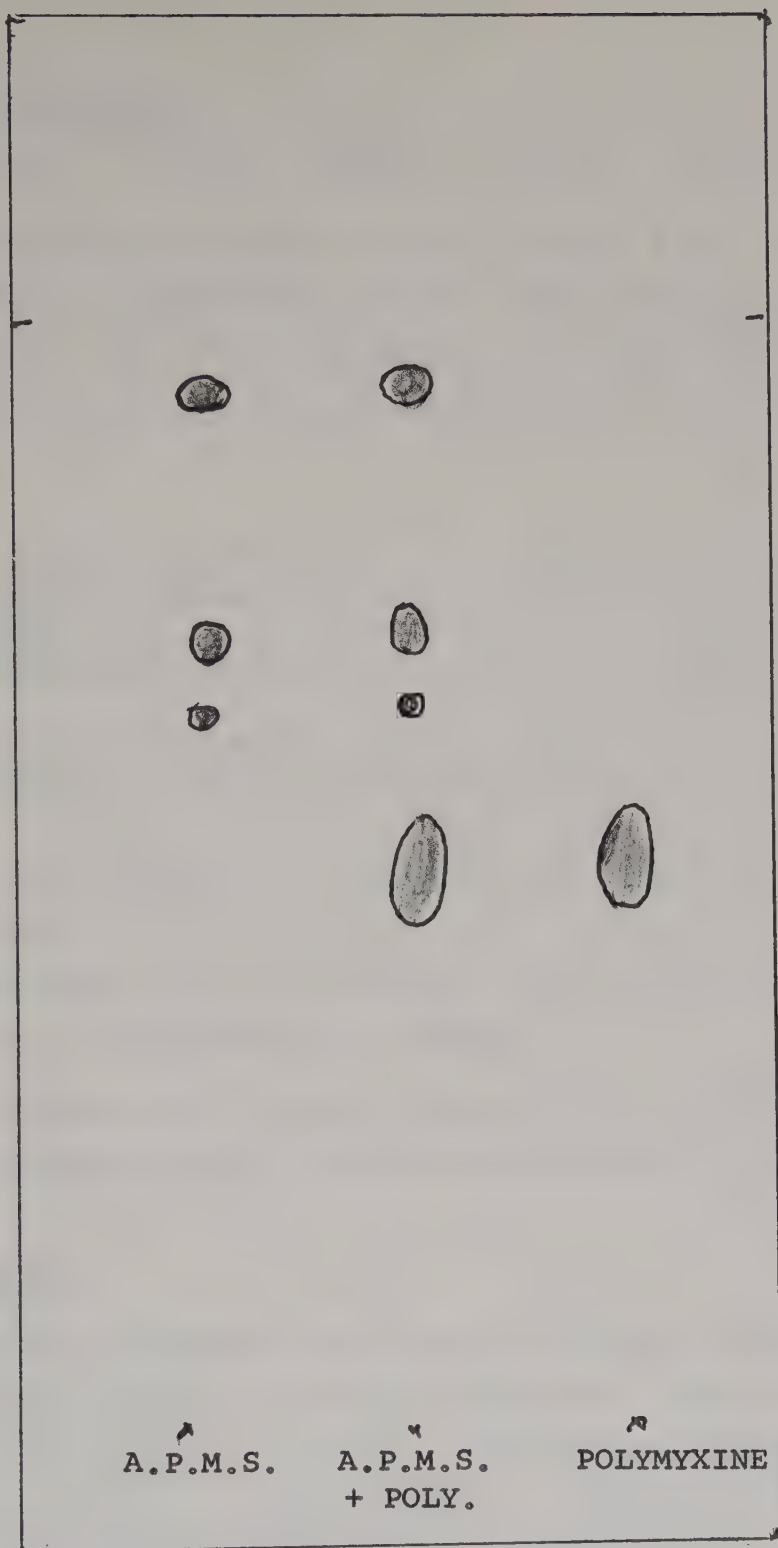


TABLEAU XII : SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE POLYMYXINE B
ET APMS.

. Mode opératoire :

Générateur de courant continu : appareil PLEUGER (Power supply CVC - A).

Cet appareil permet de fixer la tension à une valeur qui ne varie pas au cours de l'expérience, ce qui n'est pas le cas pour des appareils d'usage courant dans les laboratoires d'analyse médicale. Nous estimons en effet que ce facteur est prépondérant pour la reproductibilité des résultats.

. Potentiel d'expérience	300 volts
. Largeur des bandes	9 cm
. Papier	Arches 302
. Tampon électrolytique	Acide formique 5 %.
. Solution de Polymyxine	1000 mcg/ml
. Solution d' A.P.M.S. essais	4000 mcg/ml.

Nous avons déposé 10 μ l de la solution de Polymyxine et 5 μ l des solutions-essais.

La révélation est effectuée par une solution de Ninhydrine à 1 p 100 dans le n-butanol par trempage.

Après séchage des feuilles, nous avons constaté la séparation parfaite des deux dérivés Polymyxine et A.P.M.S. (Tableau XIII).

CONCLUSION

Ainsi, les déterminations physico-chimiques permettent de montrer que la molécule est bien un méthylsulfonate, (spectre I.R.), sa pureté chimique est excellente (cendres sulfuriques), son identité et sa nature anionique sont aisément mises en évidence par chromatographie sur couche mince et électrophorèse sur papier.



APMS

POLY

APMS

TABLEAU XIII :

SEPARATION ELECTROPHORETIQUE

POLYMYXINE B - APMS

CHAPITRE 3 : ANALYSE BACTERIOLOGIQUE
COMPARATIVE DE LA POLYMYXINE SULFATE
(P.S.) ET DE L'ACIDE POLYMYXINE
METHYLENE SULFONIQUE (A. P. M. S.)

Etant donné le caractère polypeptidique de la Polymyxine et de son dérivé l' A.P.M.S., il est évident que les critères physicochimiques d'analyse ne sont pas suffisants pour définir l'activité du produit. Au cours d'un contrôle de fabrication, les méthodes chimiques permettent de vérifier la présence du produit mais ces procédés d'identification ou de dosages ne sont pas spécifiques.

En effet, l'activité antibiotique dépend d'un grand nombre de facteurs stéréochimiques et elle peut diminuer au cours de la mise en forme pharmaceutique ou au cours de la conservation, tout en donnant la même réaction chimique.

Donc, sur un produit fini, (comprimé, pommade), le seul dosage garantissant l'activité antibactérienne du médicament est le dosage biologique.

C'est également le dosage biologique ou plutôt microbiologique qui définit l'intérêt thérapeutique de la préparation pharmaceutique. Il consiste à mesurer l'inhibition de la culture d'un germe de référence par une solution de l'antibiotique à essayer et à comparer les résultats avec ceux obtenus avec un étalon de l'antibiotique.

DEFINITION DE L'UNITE INTERNATIONALE DE POLYMYXINE

Plusieurs définitions ont été proposées :

- Le texte du Brevet du 19 Avril 1948 (3), donne la définition suivante :

" Une unité de Polymyxine est définie comme étant l'activité d'une quantité de Polymyxine contenue dans un centimètre cube d'agar nutritif qui empêche tout juste la culture de l'organisme d'essai qui est une variété de *Escherichia coli*, que l'on désigne par *E. coli* (Mac Leod). "

Le texte du Brevet paru dans le bulletin des U.S. Patent Office (104) pour la même compagnie, donne exactement le même texte.

- Le Federal Register (Amendments of May 25, 1968, 33 § 145.4) donne cette définition :

"Le terme unité appliqué à la Polymyxine B correspond à l'activité antibiotique contenue dans 0,1274 microgramme d'un étalon primaire de Polymyxine B ayant subi un séchage de 3 h à 60°C sous un vide de 5 mm de mercure au moins".

Cette définition est évidemment plus pratique que la précédente qui doit rester la référence permettant de recalculer la seconde.

- La Pharmacopée française 1965 donne p. 1611, une liste des étalons internationaux en 1962. A l'article "Polymyxine B", (sans spécifier s'il s'agit de la base ou d'un sel), il est noté $1 \text{ mg} = 7\,894 \text{ U.I}$ c'est-à-dire qu'une $\text{U.I} = 0,13 \text{ mcg}$.

Cette définition est très proche de celle du Federal Register.

Le procédé de dosage microbiologique de l'Acide Polymyxine Méthylène Sulfonique est identique à celui utilisé pour la Polymyxine B ; nous avons utilisé principalement la méthode de diffusion sur *Bordetella bronchiseptica* ATCC 12 714 ou ATCC 4 617 (51).

Les caractères de solubilité de l' A.P.M.S. étant différents de ceux du Sulfate de Polymyxine étalon, nous pouvions craindre une variation de la vitesse de diffusion dans la gélose qui perturberait les dosages : nous avons vérifié expérimentalement qu'il n'en est rien. Avant de décrire le procédé utilisé, nous étudions le mode d'action de la Polymyxine.

MODE D'ACTION BIOCHIMIQUE DU PRODUIT

Chaque antibiotique inhibe ou modifie une réaction particulière et très précise du métabolisme bactérien (32) mais la mise en évidence du mode d'action réel est très délicate.

D'après CARTER et MAC CARTY (26), la Polymyxine et donc l' A.P.M.S. font partie de la classe des antibiotiques qui altèrent les fonctions de la membrane plasmique en changeant les propriétés d'échanges de la cellule en raison de son affinité pour les phosphates. Cette action détergente est d'ailleurs la même pour la Polymyxine E ou Colistine (4).

Ces réactions sur la surface de la membrane, probablement avec les phosphates, peuvent être considérées comme facilitant un rapide changement d'orientation des lamelles lipoprotéiniques entraînant une altération des propriétés osmotiques de la membrane.

De nombreuses comparaisons avec les tensioactifs ont été faites (41) (84) (93). Les solutions de Polymyxine sont tensioactives, les savons sont antagonistes (14), la fixation d'une molécule de Polymyxine rendue fluorescente sur la partie lipoprotéique de la membrane osmotique de la bactérie (80) (81) explique ce phénomène qui aboutit à une lyse bactérienne (110).

Nous pouvons nous demander si le blocage des fonctions aminées et le changement des radicaux $-NH_2$ cationiques par des radicaux anioniques $-NH-CH_2-SO_3H$ ne perturbe pas ce mode d'action. La réponse à cette question est donnée par l'étude comparative des spectres antibactériens A.P.M.S. - POLYMYXINE B. Nous avons observé qu'il n'y avait aucune perte sensible d'activité (compte-tenu de l'augmentation de la masse moléculaire). Les résultats montrent en même temps que les fonctions aminées n'ont pas de rôle dans l'activité antibiotique de la Polymyxine (45).

ETUDE COMPARATIVE DES SPECTRES ANTIBACTERIENS POLYMYXINE - A.P.M.S.

L'activité d'un antibiotique sur un germe est parfaitement caractérisée par la Concentration Minimale Inhibitrice (C.M.I.), en opérant dans des conditions bien déterminées.

C'est la concentration la plus faible de l'antibiotique qui inhibe complètement la croissance du dit germe.

Ces déterminations de C.M.I. sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide : nous avons retenu ce dernier procédé, (technique des dilutions sériées en milieu gélosé (32)).

Dans la pratique, on utilise des dilutions successives de l'antibiotique en progression géométrique de raison 2. Ce procédé laisse donc une certaine imprécision puisque les valeurs peuvent aller du simple au double. Cette approximation est souvent suffisante et dans le cas de l'étude comparative entre deux antibiotiques, elle ne présente pas de difficultés de comparaison.

Nous disposons ainsi de toute une série de résultats réunis dans le Tableau N° XIV, en utilisant des souches cliniques et de laboratoires. Les C.M.I. sont exprimées en Unités Internationales par ml, de façon à ne pas tenir compte des différences de titres pondéraux entre les divers produits.

Nous avons également considéré que la présentation des résultats en mg/ml (5) (57) ne présente pas de signification puisqu'il n'existe aucune relation entre poids et unité, la base du calcul de l'unité étant d'origine microbiologique et non chimique.

HIRSCH (H.A.) et Collaborateurs (57) ont comparé des C.M.I. de Polymyxine B et de Colimycine en mcg/ml, malgré les différences très nettes d'expression de l'unité de ces deux antibiotiques et malgré leur résistance croisée (38) (66) (101).

MICRO - ORGANISMES	POLYMYXINE SULFATE Etalon US (c) en U/ml	ACIDE POLYMYXINE METHYLENE SULFONIQUE (c) en U/ml
Sarcina lutea 9 341	100,00	100,00
Salmonella typhi 124-66	12,50	25,00
Salmonella typhi 121-66	50,00	50,00
Salmonella para B 82-66	12,50	12,50
Salmonella typhimurium 250-66	12,50	12,50
Salmonella dublin 09 P	12,50	12,50
Salmonella enteritidis	25,00	12,50
Escherichia coli 2	12,50	12,50
Escherichia coli 3068	12,50	12,50
Escherichia coli Monod	12,50	12,50
Escherichia coli 10-536	6,25	6,25
Escherichia coli 13-467	6,25	6,25
Escherichia coli 4	12,50	12,50
Cilopasteurella pseudotuberculosis	100,00	100,00
Pseudomonas maltophilia	25,00	25,00
Aerobacter aerogenes	50,00	25,00
Arizona	25,00	25,00
Pseudomonas aeruginosa	100,00	50,00
Klebsiella pneumoniae	12,50	25,00
Proteus mirabilis	100,00	100,00
Proteus vulgaris	100,00	100,00
Bacillus subtilis 6633	100,00	100,00
Listeria Saint-Nazaire	100,00	100,00
Staphylococcus aureus 3569	100,00	100,00
Staphylococcus aureus 209 P	100,00	100,00
Staphylococcus albus 12-228	50,00	50,00
Micrococcus flavus	100,00	100,00
Enterococcus brevis	100,00	100,00
Streptococcus viridans (Poulet)	100,00	100,00
Streptococcus faecalis 8043	100,00	100,00

TABLEAU XIV : TABLEAU COMPARATIF DES C.M.I. DE POLYMYXINE B
ET D' A.P.M.S.

NAUMANN et AUWARTER (79) ont fait la même remarque et ajouté que la confusion est encore plus grande selon que l'on utilise les unités britanniques ou japonaises, (15) (24) (89) (94) (116).

Ces auteurs étudient les taux sériques de la Colistine et précisent qu'ils expriment leurs résultats en unités japonaises en faisant le rapport de 1 unité = 0,0333 mcg de base pure, ce qui est difficile à déterminer puisque le soluté injectable renferme en fait le méthane sulfonate de colistine.

L'examen du Tableau XIV montre une égalité parfaite d'activité entre les deux produits A.P.M.S. et Polymyxine Sulfate, sauf en ce qui concerne deux ou trois cas, l'imprécision de la méthode pouvant les expliquer.

L'étude de ce tableau nous permet également de constater l'insensibilité pratique à la Polymyxine comme à l'A.P.M.S. de :

a). *Cillobacterium pseudotuberculosis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, (tous Gram⁻).

b). *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus brevis*, *Streptococcus viridans* et *Streptococcus faecalis*, *Sarcina*, (tous Gram⁺).

Par contre, de nombreux autres germes Gram⁻ sont très sensibles tels que : *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *Escherichia coli* (diverses souches), *Pseudomonas* divers, *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*.

Quelques germes Gram⁺ comme *Staphylococcus albus* 12-228 et *Micrococcus flavus*, sont sensibles.

Comme pour la Colimycine, ce spectre étroit expliquera l'usage des associations (85).

Etant donné la nette diminution de toxicité de l' A.P.M.S. par rapport à la Polymyxine, nous pouvons noter une nette amélioration de l'indice chimiothérapeutique.

$$n = \frac{\text{Dose active}}{\text{Toxicité}}$$

Cliniquement et in vitro, la Polymyxine B et son dérivé l' A.P.M.S. sont extrêmement actifs sur les Pseudomonas.

De nombreuses confusions ont été faites sur la détermination du genre Pseudomonas et de nombreuses souches de ces germes, non productrices de pigments ont été classées comme des Achromobacter. STAINIER (98) a parfaitement étudié leurs caractères d'identification, ce qui a permis de montrer que de nombreuses souches sensibles à la Polymyxine sont bien des Pseudomonas.

De nombreuses publications cliniques montrent cette action sur les infections à Pseudomonas qui deviennent de plus en plus fréquentes. La Colimycine est également souvent employée pour lutter contre cette infection secondaire, (2) (4) (6) (20) (24) (25) (38) (56) (60) (64) (74) (76) (77) (82) (83) (89) (94) (101).

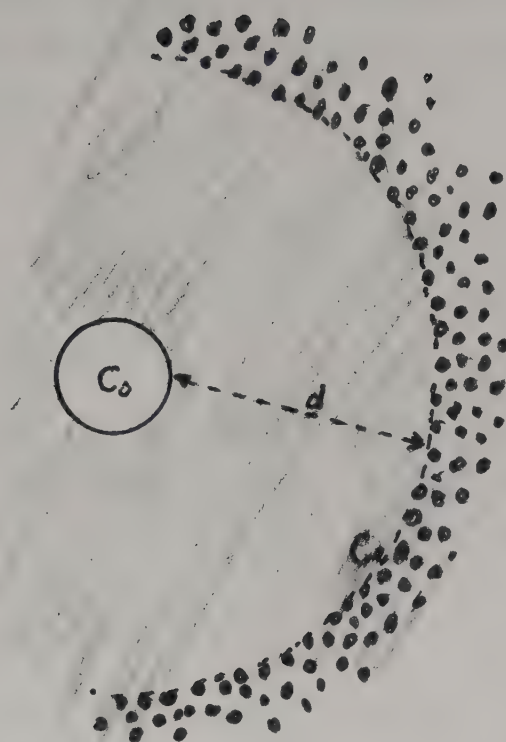
En ce qui concerne le type de résistance des microorganismes à la Polymyxine, elle semble bien être du type génétique et aucun cas de résistance transférable extrachromosomique n'a pu être cité, (30) (31) (33).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Si l'on considère un milieu nutritif gélosé du type courant, une cupule remplie d'une solution d'antibiotique de concentration C_0 , au bout d'un temps t , l'antibiotique a diffusé et la zone d'inhibition présente un rayon d . A la lisière de cette zone la concentration C_e est égale à la C.M.I.

D étant la constante de diffusion, COOPER a donné la formule suivante :

$$d^2 = 4 D t \cdot 2,3 (\text{Log } C_0 - \text{Log } C_e)$$



Nous avons montré précédemment que les C.M.I. d' A.P.M.S. et de Polymyxine sont égales : donc pour les deux produits C_e est toujours la même. Si nous partons de concentrations C_0 identiques et si à la fin du même temps t les diamètres sont égaux, la constante de diffusion sera la même ; par conséquent, l'A.P.M.S. peut-être dosé par comparaison avec un étalon international de Polymyxine.

Le facteur d intervient au carré, aussi les lectures des diamètres d'inhibitions sont-elles portées sur papier semi-logarithmique (la croissance des germes est logarithmique).

Partie expérimentale :

Nous avons préparé des solutions d'A.P.M.S. et de Polymyxine équivalentes en unités et nous les avons réparties selon le détail du tableau suivant :

C _o	DIAMETRES D'INHIBITIONS = d exprimés en unités de lecture arbitraires								MOYENNES
GAMME DE POLYMYXINE									
40 u/ml	4,25	4,00	4,25	4,25	4,00	4,00	4,00	4,10	
100 u/ml	5,25	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,03	
250 u/ml	6,00	6,00	5,75	6,00	5,75	5,75	6,00	5,89	
GAMME D' A.P.M.S.									
40 u/ml	4,25	4,25	4,25	4,00	4,00	4,00	4,00	4,10	
100 u/ml	5,25	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,03	
250 u/ml	6,00	5,75	6,00	5,75	5,75	5,75	6,00	5,85	

Les deux courbes sur papier semi-logarithmique sont absolument parallèles et l'égalité des distances d montre que les coefficients de diffusions sont identiques, (Tableau XV).

RESULTATS OBTENUS

Il est évident que le dosage bactériologique représente le dosage spécifique de l'activité antibiotique ; nous avons donc suivi toutes nos fabrications par le dosage bactériologique et la détermination de la D1 50, pour les toxicités, (voir chapitre suivant).

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre 2, l'augmentation de masse moléculaire de l' A.P.M.S. par rapport à celle du Sulfate de Polymyxine B entraîne de toute façon une baisse de titre.

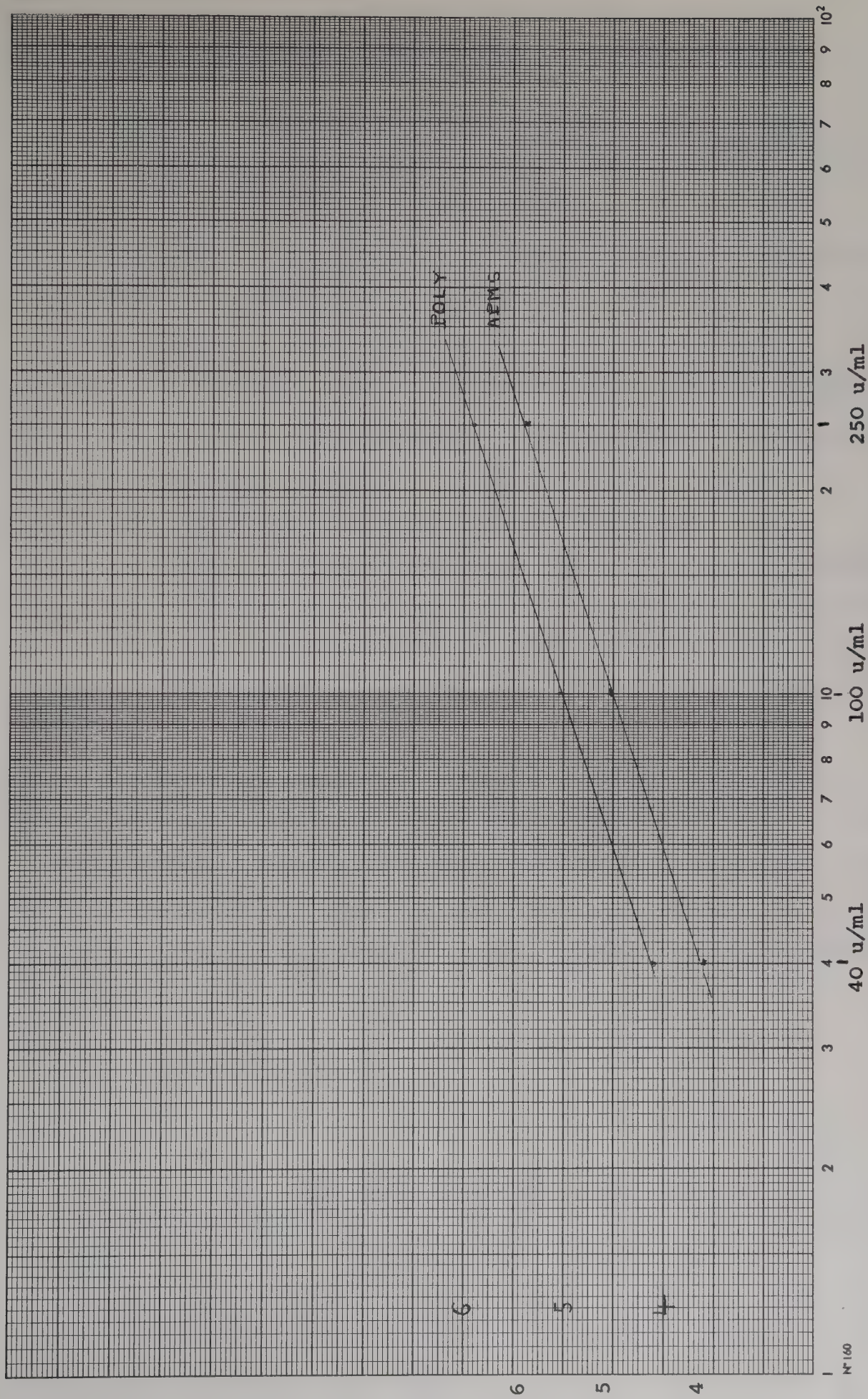


TABLEAU XV : COMPARAISON DES CONSTANTES DE DIFFUSION EN GELOSE POLYMYXINE ET A. P. M. S. 65

Les Pharmacopées diverses et la 18ème note technique Pro Pharmacopoea donnent comme limite d'activité du Sulfate de Polymyxine, le chiffre de 6 000 U.I/mg.

Nous pourrions prendre comme limite d'activité inférieure de l' A.P.M.S. la valeur $6\ 000 \times 0,88$ soit 5 280 U.I/mg.

En pratique, nous avons trouvé des titres voisins de 5 000 U.I/mg. Parfois, le résultat a été trouvé inférieur pour deux raisons :

- . nous partons d'un mélange de polypeptides à action Polymyxine B, donc de structure variable.

- . le rendement d'activité est inférieur à 1.

Nous avons couramment considéré comme acceptables les lots dont les titres ont été trouvés supérieurs à 5 000 U.I/mg. Les résultats mentionnés dans le tableau N° V en sont une illustration. Nous n'y avons pas fait figurer les résultats inférieurs à 5 000 U.I/mg obtenus avec certains lots.

La détermination de ce titre a été faite régulièrement sur certains lots maintenus en stabilité, comme le lot ST₂ et aucune baisse sensible de titre n'a été observée au bout de deux ans.

Le titre réel trouvé sur les lots permet de calculer la quantité réelle de produit à introduire dans la forme finale pharmaceutique.

CHAPITRE 4 : ANALYSE TOXICOLOGIQUE
COMPARATIVE DE L' A. P. M. S. ET DU
SULFATE DE POLYMYXINE B

Les Polymyxines sont considérées comme des antibiotiques toxiques (5) (7) (21) (22) (44) (45) (46) (50) (108). En ce qui concerne la Polymyxine B, (plus toxique que la Polymyxine E), la D1 50 chez la souris par voie veineuse est donnée à des valeurs variables allant de 6,8 mg/kg (5) à 9,3 mg/kg, (7) (44).

Les doses léthales par injections intraveineuses à des souris provoquent la mort par dépression respiratoire en cinq minutes environ, en même temps que l'on observe une incoordination musculaire et une paralysie des muscles du corps.

Nous avons réalisé des toxicités aiguës au Centre de Recherche où nous travaillons selon la méthode graphique de LITCHFIELD et WILCOXON.

Nous n'envisagerons que la toxicité par voie I.V. chez la souris et les manifestations toxiques chez l'homme par voie parentérale. En effet, per os, le produit n'est pas ou peu absorbé et ne présente donc pas de toxicité notoire, (15) (29) (90). Son administration orale n'a comme but que d'agir sur les germes de la lumière intestinale.

Pour mémoire, nous citerons que surtout dans les débuts, des études de la Polymyxine B ou Aérosporine et de la Polymyxine E ou Colimycine ont été faites en comparaison, (38) (42) (57) (66) (82) (83) (101).

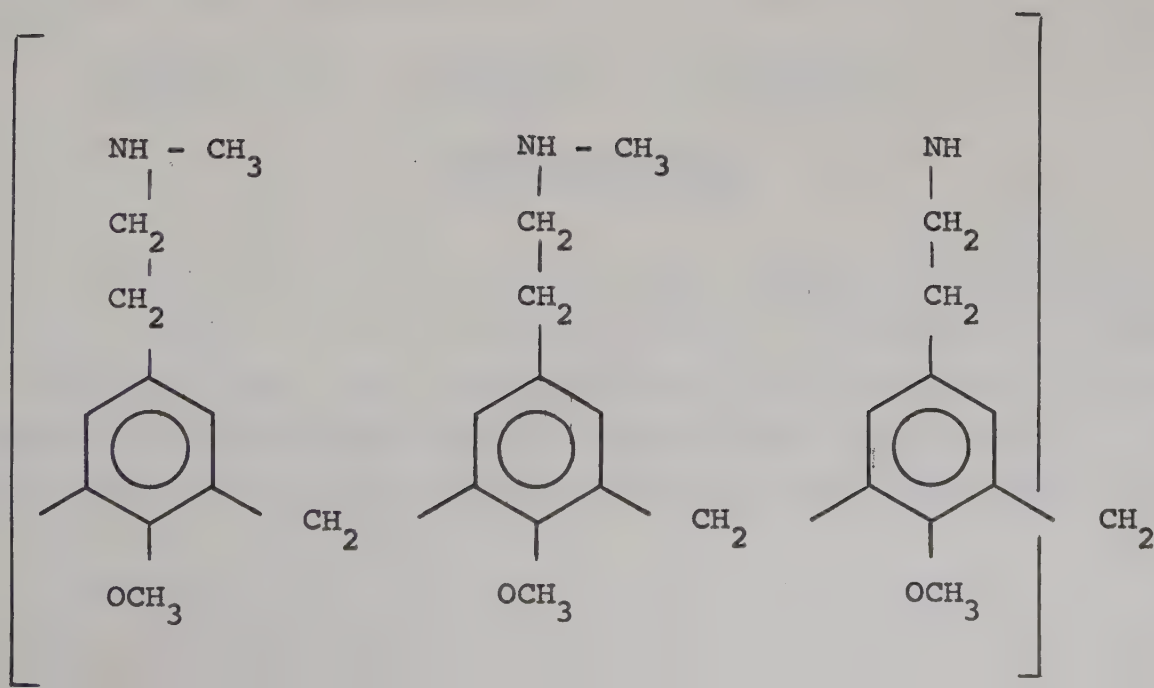
HALPERN (G) (53) dans une thèse de Doctorat en Médecine, étudie la toxicité de la Polymyxine B parallèlement à celle de la Colistine et du Méthane Sulfonate de Colistine.

Lors de l'injection intramusculaire de Polymyxine B à des doses thérapeutiques habituelles, on peut observer des phénomènes qui présentent une analogie avec des accidents allergiques : prurit, oedème et surtout modification de la pression artérielle.

D'après de nombreux auteurs (2) (23) (54), ces manifestations de la toxicité sur la souris seraient dues à une décharge d'histamine dans l'organisme. Cette étude a été faite comparativement avec des libérateurs d'histamine antérieurement connus (48/80).

Ces manifestations sont à rapprocher des phénomènes de mastocalcergie décrits par SELYE (95) et COTTY (34) puisque ces auteurs utilisent la Polymyxine B parallèlement au composé 48/80, produit de polymérisation du p-méthoxyphenethyméthylamine avec le formaldéhyde.

FORMULE du 48/80



Les nombreux essais réalisés par ces auteurs montrent une nette amélioration des symptômes décrits par les antihistaminiques.

Des auteurs japonais HARADA et TAKEUCHI (54) ont montré également que l'injection intradermique de Polymyxine B, de même que de Showdomycine et de Formycine, augmentait la perméabilité vasculaire, ce qui est à rapprocher du même phénomène.

BARNETT (M) et Collaborateurs (7) ont partiellement étudié les toxicités de la Polymyxine B et des Méthanes Sulfonates de Polymyxine sodiques et ont représenté le Tableau XVI :

	Dl 50 (mg/kg)
. Polymyxine B Sulfate	8
. Méthane Sulfonate 1	128
. Méthane Sulfonate 2	135
. Méthane Sulfonate 3	607
. Colistine Sulfate	10
. Colistine Méthane Sulfonate	550

TABLEAU XVI : TOXICITES DE POLYMYXINE ET
METHANESULFONATES.

Nous pouvons constater de grandes variations de toxicités aiguës pour les différents lots essayés de Méthane Sulfonate de Polymyxine. Les titres et les C.M.I. sont également très variables, ce qui est expliqué par les différences de substitutions des produits. C'est aussi pour cette raison qu'il a fallu modifier la technique de fabrication.

TOXICITE AIGUE DE L' A.P.M.S. PAR VOIE I.V. CHEZ LA SOURIS

Nous avons réalisé par le même procédé graphique de LITCHFIELD et WILCOXON, les toxicités de nos dérivés A.P.M.S. Nous avons été gêné par le fait que ce nouvel acide organique est très peu soluble dans l'eau. L'expérience nous a montré qu'il était d'autant moins soluble dans l'eau froide et moins toxique qu'il était bien substitué. Pour l'exemple donné ci-après, la dissolution a été très longue, (5 h).

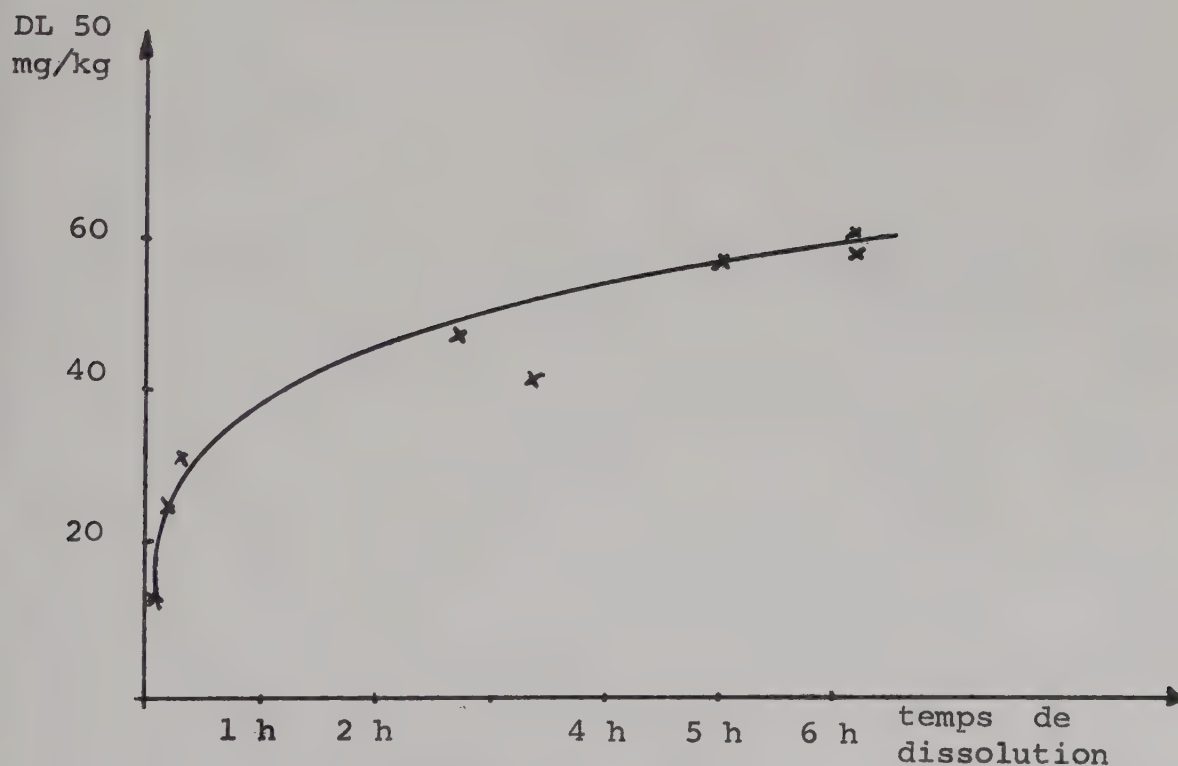
Doses en mg/kg	Nombre d'ani- maux	Mortalité dans le temps										
		0	1 h	3 h	6 h	24 h	2 j	3 j	4 j	5 j	6 j	%
80	3	3										100
70	10	10	9									90
60	10	10	6									60
55	10	10	4									40
50	10	10	2									20

Nous pouvons constater à l'examen de ce tableau que les manifestations toxiques sont immédiates et que dès la première heure, les animaux meurent. Ensuite, il n'y a plus de manifestation toxique.

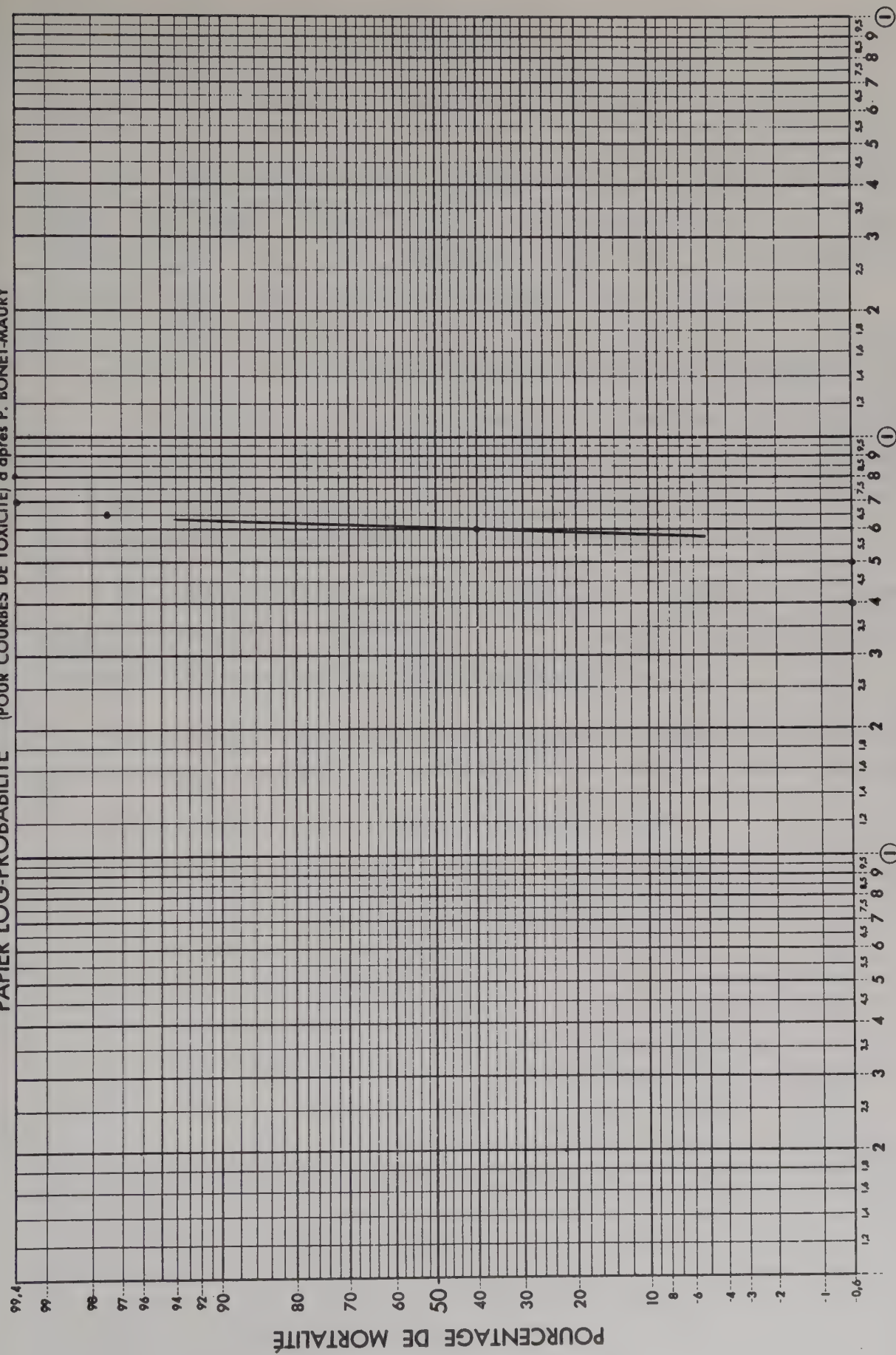
L'étude de la courbe ci-jointe montre que la toxicité calculée du lot 012 - 95 - 0205 a été de 57,5 mg/kg.

Nous groupons dans le tableau suivant, à titre comparatif, les résultats de D1 50 des A.P.M.S. et les temps de dissolution :

NUMEROS	LOTS	DL 50	TEMPS DE DISSOLUTION
01		34,00 mg/kg	20 minutes
02		14,00 mg/kg	2 minutes
03		27,50 mg/kg	10 minutes
04		14,00 mg/kg	3 minutes
05		57,50 mg/kg	5 heures
06		46,00 mg/kg	2 heures 30 minutes
07		38,00 mg/kg	3 heures
08		48,00 mg/kg	6 heures
09		61,00 mg/kg	6 heures



COURBE REPRESENTANT LES DL 50 EN mg/kg, EN FONCTION DES
TEMPS DE DISSOLUTION



DOSE DE TOXIQUE

$DL_{50} = 61 \text{ mg.}$

APNS Pt 012 95 02 09

JOUAN - PARIS

Il n'est pas question de rechercher une proportionnalité complète entre les temps de dissolution et la qualité du produit, mais en fonction des taux de SO_2 combinés, nous avons la certitude qu'un A.P.M.S. bien substitué ne se dissout que très lentement.

C'est ce que nous avons voulu montrer par le graphique ci-dessus.

Pratiquement, il est impensable de réaliser pour chaque lot de production courante, la détermination d'une $\text{Dl } 50$. Il appartiendra au toxicologue de définir une dose d'innocuité qui permettra d'éliminer rapidement tous les lots toxiques.

Cet essai d'innocuité ou de toxicité anormale doit laisser une marge de sécurité très grande à l'utilisateur et doit permettre de conserver un bon indice chimiothérapeutique.

Ceci nous amène à voir et à étudier comment le principe actif peut être utilisé par le laboratoire de mise au point galénique.

Cette étude fera l'objet du Chapitre VI.

CHAPITRE 5 : PROCÉDÉ DE FABRICATION

DE L' A. P. M. S.

INTRODUCTION

Le détail des procédés analytiques décrit plus haut nous a incité à chercher un nouveau procédé de fabrication et nous a guidé dans nos essais.

Nous avons tout d'abord recherché un protocole qui ne laisse pas de résidu de fabrication. C'est pourquoi nous avons utilisé des gaz.

Nous avons analysé ci-dessous tous les facteurs qui peuvent influencer sur la substitution des fonctions aminées de la Polymyxine.

PREMIER STADE

Le premier stade est le même que dans les techniques classiques mais nous travaillons toujours avec un excès de formaldéhyde, que nous utilisons la solution commerciale à 30 p 100 ou la dissolution directe du gaz obtenu en chauffant par exemple, du métaldéhyde.

ETUDE DU FACTEUR CONCENTRATION

Nos essais ont été nombreux et ne nous ont pas donné toujours des résultats satisfaisants malgré la concentration excédentaire en formol :



C₁

C₂

C

Polymyxine

Formol

Méthylolpolymyxine

La loi d'action de masse nous donnera :

$$k = \frac{[C_1] \times [C_2]^5}{[C]}$$

Si nous nous arrangeons pour que la concentration moléculaire du formol soit 100 fois plus forte, ce qui sera aisé, nous aurons :

$$k = \frac{[C_1] [C_2 \times 10^2]^5}{[C]} = \frac{[C_1] [C_2]^5 \times 10^{10}}{[C]}$$

Le facteur de correction étant multiplié par 10^{10} le facteur concentration du formaldéhyde devient à ce moment-là absolument négligeable, puisque k est constant.

Nous étions en droit de penser que ce facteur agirait facilement sur la cinétique de la réaction, mais il ne fût pas suffisant.

ETUDE DU FACTEUR TEMPERATURE ET TEMPS DE REACTION

L'observation faite ensuite sur plusieurs années a été que des lots réalisés de la même façon en été et en hiver, n'étaient pas substitués de la même façon et que les lots d'hiver étaient plus toxiques.

Nous avons donc réalisé plusieurs lots à des températures variables et en maintenant des temps de contact différents, mais sans autre moyen de contrôle de la réaction que la D1 50 après dessiccation du produit.

Nous décrirons plus loin dans la partie expérimentale les divers essais qui illustrent ce paragraphe. Les résultats là aussi ont été très variables.

Nous utilisions à l'époque une eau déminéralisée et distillée, distribuée par des canalisations dans les laboratoires. Sa température était de 10 à 12°C en hiver.

Les seuls essais satisfaisants et reproductibles ont été réalisés avec de l'eau distillée en appareil Pyrex Fontavapor qui se trouvait être à la température de 20 à 25°C.

ETUDE DU FACTEUR pH

Nous avons étudié le pH de précipitation de la Polymyxine. Celle-ci précipite à pH 9.

Si nous voulons obtenir des produits dépourvus de Polymyxine, nous ne devons pas dépasser le pH de 8,5 au cours de la précipitation du méthylolpolymyxine.

Le pH de la solution de Polymyxine à la concentration M/10 environ est voisin de 6. Le pH du formol est acide mais nous avons réalisé des essais avec du formol neutralisé. Après addition du formol à la solution de Polymyxine, le pH descend rapidement à 3,5. Cette diminution du pH correspond évidemment à un blocage des fonctions -NH_2 (Tableau I).

En travaillant à 20 - 25°C, le pH évolue pendant 4 h pour se fixer à 2,5 - 2,6.

Considérant que la réaction était terminée, nous avons commencé l'alcalinisation de la solution qui a duré deux à trois heures. La précipitation des dérivés substitués commence dès pH 3,5 et se termine à pH 8,5.

La même solution $\neq \frac{M}{10}$ de Sulfate de Polymyxine a été neutralisée à pH 7 ainsi que la solution de formaldéhyde. Le pH se fixe immédiatement à 4, en provoquant un début de précipitation.

Nous utilisons à l'époque une eau déminéralisée et distillée, distribuée par des canalisations dans les laboratoires. Sa température était de 10 à 12°C en hiver.

Les seuls essais satisfaisants et reproductibles ont été réalisés avec de l'eau distillée en appareil Pyrex Fontavapor qui se trouvait être à la température de 20 à 25°C.

ETUDE DU FACTEUR pH

Nous avons étudié le pH de précipitation de la Polymyxine. Celle-ci précipite à pH 9.

Si nous voulons obtenir des produits dépourvus de Polymyxine, nous ne devrons pas dépasser le pH de 8,5 au cours de la précipitation du méthylolpolymyxine.

Le pH de la solution de Polymyxine à la concentration M/10 environ est voisin de 6. Le pH du formol est acide mais nous avons réalisé des essais avec du formol neutralisé. Après addition du formol à la solution de Polymyxine, le pH descend rapidement à 3,5. Cette diminution du pH correspond évidemment à un blocage des fonctions $-NH_2$ (Tableau I).

En travaillant à 20 - 25°C, le pH évolue pendant 4 h pour se fixer à 2,5 - 2,6.

Considérant que la réaction était terminée, nous avons commencé l'alcalinisation de la solution qui a duré deux à trois heures. La précipitation des dérivés substitués commence dès pH 3,5 et se termine à pH 8,5.

La même solution $\neq \frac{M}{10}$ de Sulfate de Polymyxine a été neutralisée à pH 7 ainsi que la solution de formaldéhyde. Le pH se fixe immédiatement à 4, en provoquant un début de précipitation.

La réaction se faisant progressivement, le pH baisse, et quand il atteint 3,5 la redissolution est presque parfaite. Le pH continue à baisser jusqu'à 2,8 - 3 et se fixe pratiquement toujours à cette valeur en travaillant à 20 - 25°C.

Nous sommes parti de la même solution $\frac{M}{10}$ à pH 6 et d'une solution de formol neutralisée, mais à température de 10 - 12°C. Le pH a évolué lentement, au bout de 4 h, il n'était qu'à pH 3,5. Le lendemain matin, il s'est trouvé fixé à 2,6 mais sans que l'on puisse fixer le moment exact, dépassant 6 h, de la fin de la réaction.

CONCLUSIONS CONCERNANT LE PREMIER STADE

Ces divers essais ont permis ainsi de fixer les conditions de travail de la réaction de formation du Méthylol.

En partant d'une solution environ $\frac{M}{10}$ de Sulfate de Polymyxine, une agitation constante étant prévue, la température de la réaction doit être fixée entre 20 et 25°C.

Le pH de la solution (pure) de formol à 30 p 100 doit être de 7 avant utilisation.

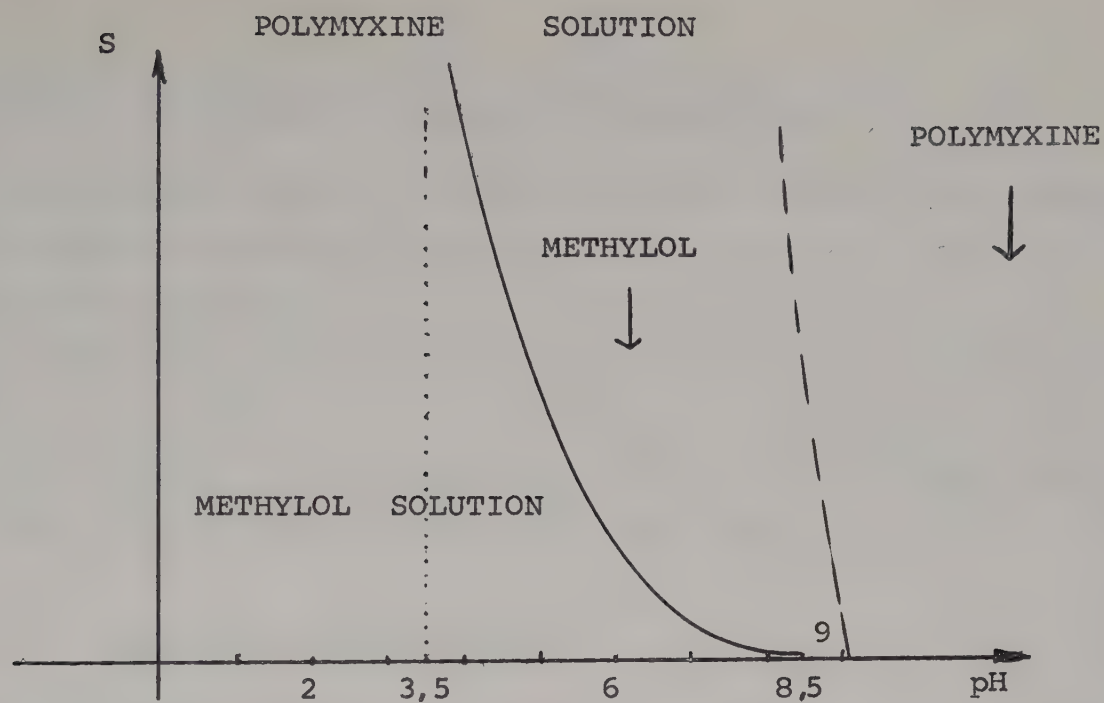
La réaction est suivie en notant le pH qui en fin de réaction se stabilise aux environs de 2,5 - 2,6. (Tab. XVIII).

Ce temps de réaction peut durer 4 heures.

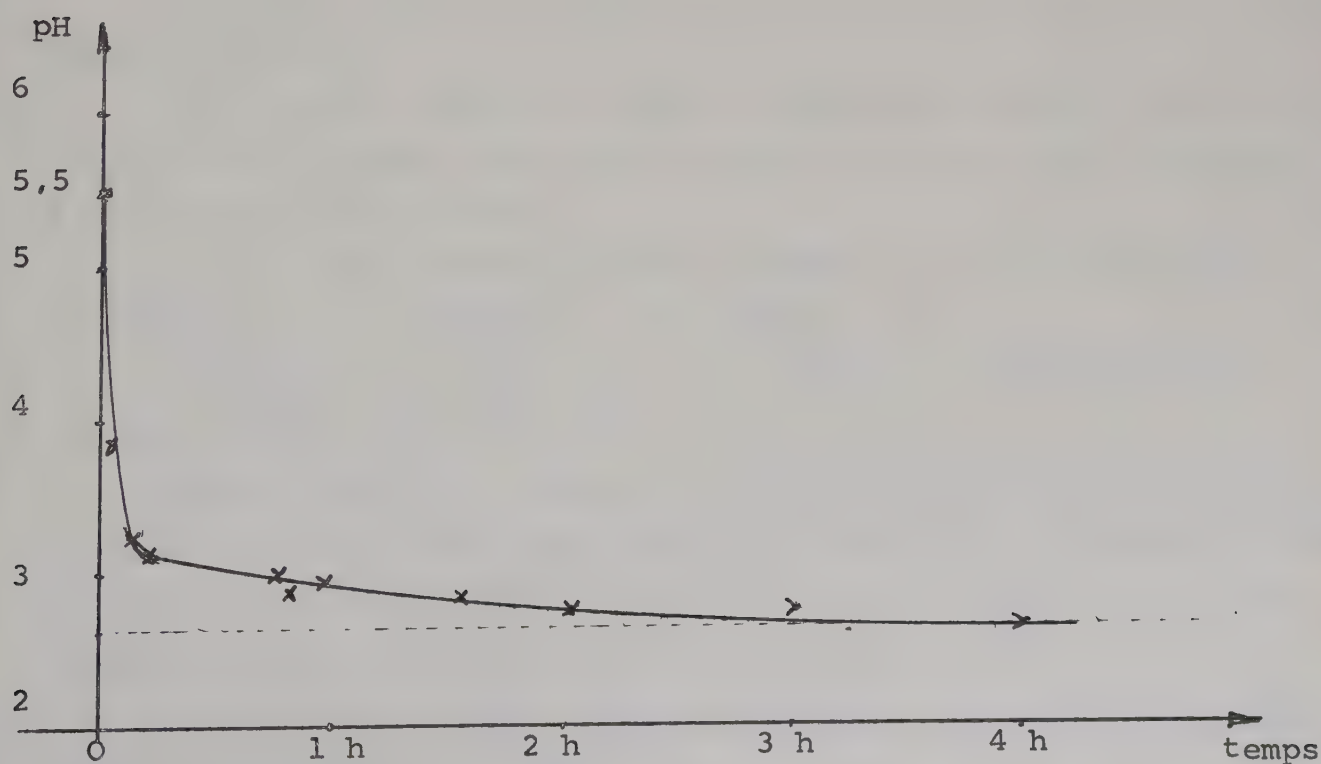
Etant assuré d'une substitution maximale en phase liquide, nous pouvions alors précipiter notre dérivé méthylolique.

Ce procédé est en même temps une méthode de purification mais il est indispensable de réaliser une alcalinisation lente et sous forte agitation. Une précipitation rapide donnerait de gros cristaux qui engloberaient du Sulfate de Sodium et seraient donc impurs.

Dans un deuxième temps, après précipitation complète, le précipité est filtré et lavé jusqu'à disparition de toutes traces de sulfates (vérification de la disparition des sulfates dans le filtrat).



COURBE DE PRECIPITATION DU METHYLOL ET DE LA POLYMYXINE



TABEAU XVIII : VARIATION DU pH AU COURS DE LA METHYLOLATION

DEUXIEME STADE : SULFONATION

Nous faisons réagir le méthylol avec de l'acide sulfureux en excès puisque la réaction se fait sous un barbotage constant d'anhydride sulfureux.

Le stade final de dessiccation sous vide à basse température, permet de nous donner un A.P.M.S. dépourvu de tout excès d'anhydride sulfureux, l'excès de celui-ci étant éliminé par la lyophilisation puis par un séchage ultérieur à 60°C sous vide.

PARTIE EXPERIMENTALE

ESSAIS PRELIMINAIRES

- PREMIER EXEMPLE :

. 5 grammes de Sulfate de Polymyxine titrant 7 500 U.I/mg ont été dissous dans 100 ml d'eau.

. 20 ml de solution de Formaldéhyde à 30 % ont été alors ajoutés à cette solution.

. La solution acide maintenue en agitation pendant 15 minutes, le pH de la solution a été ensuite amené, toujours sous agitation, à 8,5 au moyen de soude N.

. L'agitation a été maintenue pendant 1 h, le pH contrôlé périodiquement et réajusté le cas échéant à 8,5.

. Pendant cette opération, il se forme un précipité blanc dû à la formation d'un dérivé méthylol.

. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, (suivis chaque fois d'une filtration), nous avons remis le précipité en suspension dans 200 ml d'eau et nous avons porté la suspension à une température voisine de 65°C, en maintenant une forte agitation.

Nous avons alors fait passer un courant de SO_2 dans la suspension jusqu'à dissolution complète.

Cette solution a été filtrée et le filtrat congelé puis soumis à une évaporation sous vide à basse température.

Résultats :

Quantité d' A.P.M.S.	5 g.
Rendement en titre	75 p 100.
Titre biologique	5400 U.I/mg.

Lors de cet essai, nous n'avions noté ni la température, ni le pH, mais comme nous le disions précédemment, la température de la réaction devait être de 25°C, étant donné que la fabrication avait été réalisée en été.

- DEUXIEME EXEMPLE :

Quantité mise en oeuvre : 10 g de Sulfate de Polymyxine (S.P) à 7 400 U.I/mg dissous dans 100 ml d'eau distillée à température ambiante (20-25°C) + Formaldéhyde à 30 p 100 = 25 ml.

Contact 20 mn sous agitation.

La sulfonation s'est pratiquée à 60 - 65°C et n'a pas été sensiblement différente de la précédente.

Résultats :

9,2 g de produit titrant 5 000 U.I/mg.
Rendement en titre : 62 p 100.

- TROISIEME EXEMPLE :

Même essai qu'exemple 2, mais lavage avec un mélange Méthanol - Eau.

La sulfonation s'est faite dans un mélange Méthanol - Eau à 56°C sans reflux et l'anhydride sulfureux est passé pendant une demi-heure dans ce mélange.

Au bout de 15 minutes, nous avons vu la structure particulière changer, en donnant de très fins cristaux. Au bout d'une demi-heure, la transformation a été totale.

Le produit a été filtré, séché sous vide à 56°C, puis broyé.

Résultats :

10,2 g d'A.P.M.S.

Titre biologique 5 375 U.I/mg.

Le spectre infra-rouge de ce produit est caractéristique de l' Acide Polymyxine Méthylène Sulfonique. Cependant, cet essai ne nous a rien apporté de plus que les précédents.

La D1 50 de ce produit n'a pas été faite et le problème résidant dans la méthylation et dans une bonne substitution, nous n'avons pas récidivé : cet essai n'a pas été repris.

- QUATRIEME EXEMPLE :

Protocole de fabrication semblable mais avec Formol gazeux.

Résultats :

8,9 g d'A.P.M.S. titrant 5 100 U.I/mg.

Rendement 61 p 100 en titre.

- CINQUIEME EXEMPLE :

Même protocole de fabrication mais le méthylolpolymyxine en suspension est versé dans la solution saturée d'anhydride sulfureux chaude (70°C) par petites portions.

Résultats :

10 g d'A.P.M.S. titrant 6 000 U.I/mg.

Rendement 80 p 100.

Dans le stade suivant, nous avons fabriqué un lot de ce produit d'une manière semi-industrielle, en réalisant la lyophilisation sur un lyophilisateur USIFROID industriel.

PREMIERE PRODUCTION SEMI-INDUSTRIELLE D' A.P.M.S.

Nous avons obtenu le lot ST₂ qui à l'état sec a été stable trois ans.

Nous sommes parti de 450 g de Sulfate de Polymyxine non stérile que nous avons dissous dans 2,5 litres d'eau.

Nous avons fait agir 0,75 l de solution de formol à 30 p 100 pure, pendant 45 minutes à température ambiante (28°C).

Puis, sous agitation violente, nous avons amené par affusion de soude 1 N, le pH à 8,5. Le dérivé méthylol précipite à ce stade, le pH a été réajusté à 8,5 pendant au moins une heure.

Ce méthylol a été relavé 5 fois dans 3 litres d'eau distillée par agitation et filtration.

Dans un réacteur de 10 litres, nous avons mis 5 litres d'eau que nous avons portés à 69 - 70°C, au moyen d'un bain-marie à vapeur.

Nous avons fait à ce stade un barbotage de SO₂ provenant d'une bouteille de SO₂ liquide afin de saturer l'eau.

Par ailleurs, le méthylol a été mis en suspension dans 1,5 l d'eau et la suspension a été ajoutée par petites fractions de 25 ml environ, grâce à une ampoule à brome munie d'un agitateur.

La température est toujours régulée à 69 - 70°C.

Le méthylol ainsi ajouté se transforme en dérivé méthylène sulfonique substitué, soluble dans l'eau à cette température.

Nous n'avons ajouté de nouvelles quantités de suspension qu'après dissolution complète du méthylol.

Nous avons encore ajouté 500 ml d'eau à 70°C afin de permettre une meilleure dissolution du dérivé. Nous pensons que si cette quantité avait été ajoutée au début de l'opération, rien n'aurait été changé.

Quand les dernières quantités de Méthylol (y compris le rinçage des récipients) ont été dissoutes, la solution a subi une filtration stérilisante à chaud et a été recueillie dans un récipient thermostaté. Cette opération (dissolution-filtration) a duré 2 h 30.

Après rinçage du filtre à l'eau distillée, chauffée à 70°C, la solution chaude est immédiatement congelée à - 40°C et ensuite lyophilisée. Température des plateaux : 65°C en fin d'opération.

La lyophilisation a duré 24 - 25 heures. Le dérivé obtenu ne semblant pas absolument dépourvu de SO_2 a été resséché 3 h à 60°C, sous vide afin d'éliminer les dernières traces de constituants volatils.

Le produit ST_2 était d'excellente qualité et présentait une toxicité faible.

Un deuxième essai similaire nous donna un produit ST_3 qui tout en étant stable présentait une toxicité plus grande, mais acceptable.

Sachant que les Polymyxines commerciales ne sont pas pures, nous avons fait une série de fabrications sur un lot de Sulfate de Polymyxine considéré comme mauvais ou du moins de qualité acceptable, mais moyenne et destiné à l'usage dermique.

Une deuxième série de fabrications ont été pratiquées sur un lot de Sulfate de Polymyxine de qualité parentérale.

Le stade de lyophilisation a été réalisé dans des petits flacons sur un lyophilisateur Usifroid de Laboratoire. La réfrigération et la congélation étant réalisées par un mélange de neige carbonique et de méthanol.

Les divers essais menés systématiquement avec des Polymyxines de qualités différentes nous ont montré que celles-ci n'intervenaient pas tellement dans la qualité de l' A.P.M.S. obtenu.

Les essais physico-chimiques réalisés précédemment nous ont permis de résumer la fabrication des lots de la façon suivante :

Première phase :

Mise en solution de la Polymyxine dans un excès de solution de formol.

- . Température de réaction 20-25°C.
- . L'eau doit être distillée dans des appareils en pyrex.
- . Suivre la réaction jusqu'à stabilisation du pH vers 2,5 - 3.
- . Alcalinisation lente par la Soude N jusqu'à pH 8,5.
- . Lavage du précipité jusqu'à élimination des ions sulfates.

Deuxième phase :

Préparation d'une solution saturée de SO_2 à la température de 60 - 65°C.

- . Mise en suspension du méthylol dans l'eau.
- . Introduction progressive de cette suspension jusqu'à dissolution complète à chaque affusion.
- . Congèlation rapide de la solution et lyophilisation.
- . Séchage complémentaire à 60°C sous vide.

Ce procédé nous a permis d'obtenir tous les derniers lots qui ont fait l'objet d'une étude analytique aux chapitres précédents.

CHAPITRE 6 : M I S E E N F O R M E G A L E N I Q U E D E L' A. P. M. S.

Les diverses méthodes de l'analyse ont permis de suivre et d'améliorer la fabrication de l' A.P.M.S. L'étude de la mise en forme galénique consacre une fois de plus la constante omniprésence de l'analyse. Elle intervient en effet au niveau du choix de la forme pharmaceutique ainsi qu'à celui de l'étude de stabilité.

Le cas de l' A.P.M.S. , développé dans le présent chapitre met ces deux interventions en évidence ; en particulier, c'est l'analyse qui a permis de constater la formation d'un nouveau dérivé dans certaines formes pharmaceutiques.

CHOIX DE LA FORME PHARMACEUTIQUE

L' A.P.M.S. présente un titre légèrement inférieur à celui du Sulfate de Polymyxine (5000 pour 6500 U.I/mg), mais une toxicité plus faible (DL 50 de 50 mg/kg pour l' A.P.M.S. et 6,5 à 7 mg/kg pour le Sulfate).

L'amélioration de son indice chimiothérapeutique est évident.

LA VOIE BUCCALE

La Polymyxine sous forme de Sulfate n'est que peu toxique par cette voie car elle n'est pas absorbée et dans ce cas, elle n'est utilisée que pour agir sur des germes de la lumière intestinale.

Certains auteurs (90) signalent l'absorption de petites quantités d'antibiotiques par la muqueuse intestinale des nouveaux-nés. Ce phénomène est néanmoins peu intéressant.

Cette voie pouvait-elle être intéressante pour l' A.P.M.S. ? Bien que l'essai n'ait pas été réalisé, nous ne le pensons pas, et il y a même de fortes chances pour que ce dérivé soit hydrolysé par les pH acides du suc gastrique.

LA VOIE PARENTERALE

La voie parentérale présente pour l' A.P.M.S. un intérêt tout particulier.

Déjà et malgré sa toxicité, le Sulfate de Polymyxine était utilisé en injection intramusculaire et même intrarachidienne dans de nombreuses septicémies à bacilles Gram⁻.

La voie parentérale apparaît la meilleure pour l'utilisation du produit qui, comme nous l'avons vu, est d'autant plus insoluble qu'il est moins toxique.

Son insolubilité dans l'eau et les solutions isotoniques classiquement utilisées en clinique, en rend l'utilisation difficile sous forme de flacon de poudre sèche stérile, à mettre en solution au moment de l'emploi.

C'est pourquoi nous avons cherché un solvant approprié pour le dissoudre rapidement sous forme de poudre sèche.

CHOIX D'UN SOLVANT

EAU, SOLUTES ISOTONIQUES DE NaCl OU DE GLUCOSE

A priori, le solvant de choix semblait l'eau, puisque le nouvel antibiotique était un produit lyophile.

L' addition d'eau sur cet acide organique en poudre ou le processus inverse qui consiste à verser la poudre d' A.P.M.S. dans l'eau, le soluté isotonique de chlorure de sodium ou le glucose, provoquent une prise en masse gommeuse du produit et rendent ensuite sa dissolution mauvaise et lente.

Ce phénomène est dû à sa nature d'acide organique à haut poids moléculaire.

SOLUTE DE CARBONATE MONOSODIQUE

qui transforme l'acide en sel de sodium et conduit à de meilleurs résultats. Mais la durée de dissolution est encore trop lente.

SOLVANTS ORGANIQUES BIOLOGIQUES (70)

Deux solvants furent retenus parmi les six solvants utilisés seuls ou en dilution dans quelques formes pharmaceutiques :

- . Le Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- . Le Diméthylacétamide
- . Le Lactate d'Ethyle
- . Le Glycofurol
- . Le N-Hydroxyéthylactamide
- . Le Propylène Glycol.

Le Propylène Glycol et le Glycofurol furent repoussés en raison du pouvoir nécrosant qu'ils ont présenté dans certains cas. Le DMSO à la concentration utile était trop toxique (15) (28).

En revanche, le Diméthylacétamide et le N-Hydroxyéthylactamide ont été retenus. Nous pensons que l'analogie structurale entre la fonction amide et les fonctions peptides favorise la mise en solution.

SOLUTION DANS LE DIMETHYLACETAMIDE (DMA)

La concentration antibiotique choisie est celle des flacons de poudre stérile de Sulfate de Polymyxine Pfizer-Clin à 500 000 U.I. par dose thérapeutique.

La quantité équivalente d' A.P.M.S. est dissoute dans le DMA à 20 p 100 dans l'eau et le DMA à 25 p 100.

Les résultats des DL 50 exprimées en A.P.M.S. Poids furent les suivants (en mg par kg de souris)

PREPARATION	DL 50
A. P. M. S. - DMA 20 %	35
A. P. M. S. - DMA 25 %	37
A. P. M. S. - Soluté NaCl	60

La dissolution dans le DMA augmente donc de manière notable la toxicité aigüe de l' A.P.M.S.

D'autre part, à cette concentration le DMA provoque à la longue une atteinte hépatique non négligeable.

Aussi ce solvant a-t-il été abandonné.

SOLUTION DANS LE N-HYDROXYETHYLACTAMIDE

Le N-Hydroxyéthylactamide (NHEL)



est à l'état pur, un liquide visqueux ; il est utilisé dans quelques spécialités (solutions d'antibiotiques), sous forme de NHEL à 30 p 100 d'eau. Cette solution incolore assez mobile, dissout assez rapidement l' A.P.M.S. ; il est alors possible avec ce solvant de prévoir comme forme pharmaceutique, un flacon de poudre sèche d'antibiotique accompagné d'une ampoule de solvant.

STABILITE DE LA SOLUTION EXTEMPORANEE

Il est nécessaire d'étudier le titre de cette solution et de vérifier sa stabilité dans le temps.

Les résultats montrent que la solution reste stable au moins 72 heures.

PREPARATION D'UNE SOLUTION D' A.P.M.S. DANS LE NHEL
 =====

Il était plus intéressant de mettre au point une solution stable afin d'éviter la dissolution au moment de l'emploi.

Après quelques essais, la formule suivante a été mise au point :

Formule unitaire

- . A.P.M.S. Poids correspondant à 500 000 U.I de Polymyxine
- . N.H.E.L. En solution aqueuse à 70 p 100 - 2 ml
- . EAU Pour préparations injectables Q.S.P. 5 ml
- . HCl dilué Q.S.P. pH 6.

La solution obtenue est claire, limpide et répond aux caractéristiques des préparations injectables.

L'analyse de cette solution a fait apparaître des anomalies :

Toxicité aiguë sur la souris

En effet, au moyen du procédé décrit, nous avons déterminé les DL 50 sur souris, de la solution, en exprimant les concentrations en poids d' A.P.M.S.

Nous avons constaté le fait suivant :

La D1 50 du lot ST₂ a été trouvée égale à 62 mg/kg. En revanche, la D1 50 de ce même lot, demeuré en solution depuis huit jours, a été trouvée égale à 147 mg/kg.

Cette découverte due à l'analyse ne pouvait s'expliquer que par la formation d'un composé nouveau dans la solution.

Le tableau N° XIX montre les améliorations systématiques de la D1 50 pour divers lots après leur mise en solution dans le NHEL.

L O T S	Dl 50 en mg/kg d' A.P.M.S.	
	Dans l'eau	Dans le NHEL
ST ₂	62	147
ST ₃	30	115
ST ₄	28	108
ST ₅	23	75
ST ₆	32	140
ST ₇	47	175
ST ₈	23	135
ST ₉	33	115
ST ₁₀	37,5	

TABLEAU N° XIX : Dl 50 DE L' A.P.M.S. ET DE
L' A.P.M.S. - N.H.E.L.

L'amélioration de l'innocuité ne se fait donc pas toujours de la même manière et l'on peut constater par exemple que le lot ST₈ assez toxique avec une Dl 50 de 23 mg/kg, a donné une Dl 50 finale de 135 mg/kg, alors que le lot ST₉ n'est passé que de 33 à 115 mg/kg.

Etude chimique du composé formé

. Hypothèses de travail :

Les deux composés originaux en présence pouvant réagir entre eux en solution aqueuse sont l' A.P.M.S. (acide polysulfonique) et le N.H.E.L. (amide dialcool) : la seule réaction possible semble être une estérification entre les fonctions sulfoniques de l' A.P.M.S. et les fonctions alcools de la N.H.E.L.

Cette réaction d'estérification est lente comme toutes les estérifications et à température ambiante atteint son état stable au bout de huit jours environ puisque la toxicité elle-même varie en huit jours.

. Preuves d'une combinaison :

Disposant d'un spectrophotomètre I.R., nous pouvions espérer obtenir une preuve de la modification de la formule dans le temps. Malheureusement, la solution aqueuse de N.H.E.L. ne permet pas une recherche directe du fait de l'obligation de travailler en cuve de chlorure de sodium. Aussi nous avons eu recours aux spectres de réflexion totale appelés spectres A.T.R. (Attenuated Total Reflectance).

La signification de ces spectres n'est pas absolument la même que celle des spectres d'absorption ; cependant, nous vérifions par ce procédé qu'une réaction s'est produite entre le principe actif et le solvant.

L'expérience et le calcul montrent (68) que la nature du spectre est influencée par le nombre de réflexions. Sans entrer dans le détail du phénomène, nous pouvons considérer qu'à chaque réflexion il y a une sommation des absorptions moléculaires du produit.

Le faisceau I.R. réfléchi plusieurs fois est ensuite renvoyé par un jeu de miroirs dans le monochromateur et le spectre enregistré.

Nous avons utilisé une cuve donnant 9 réflexions totales (TR 9S).

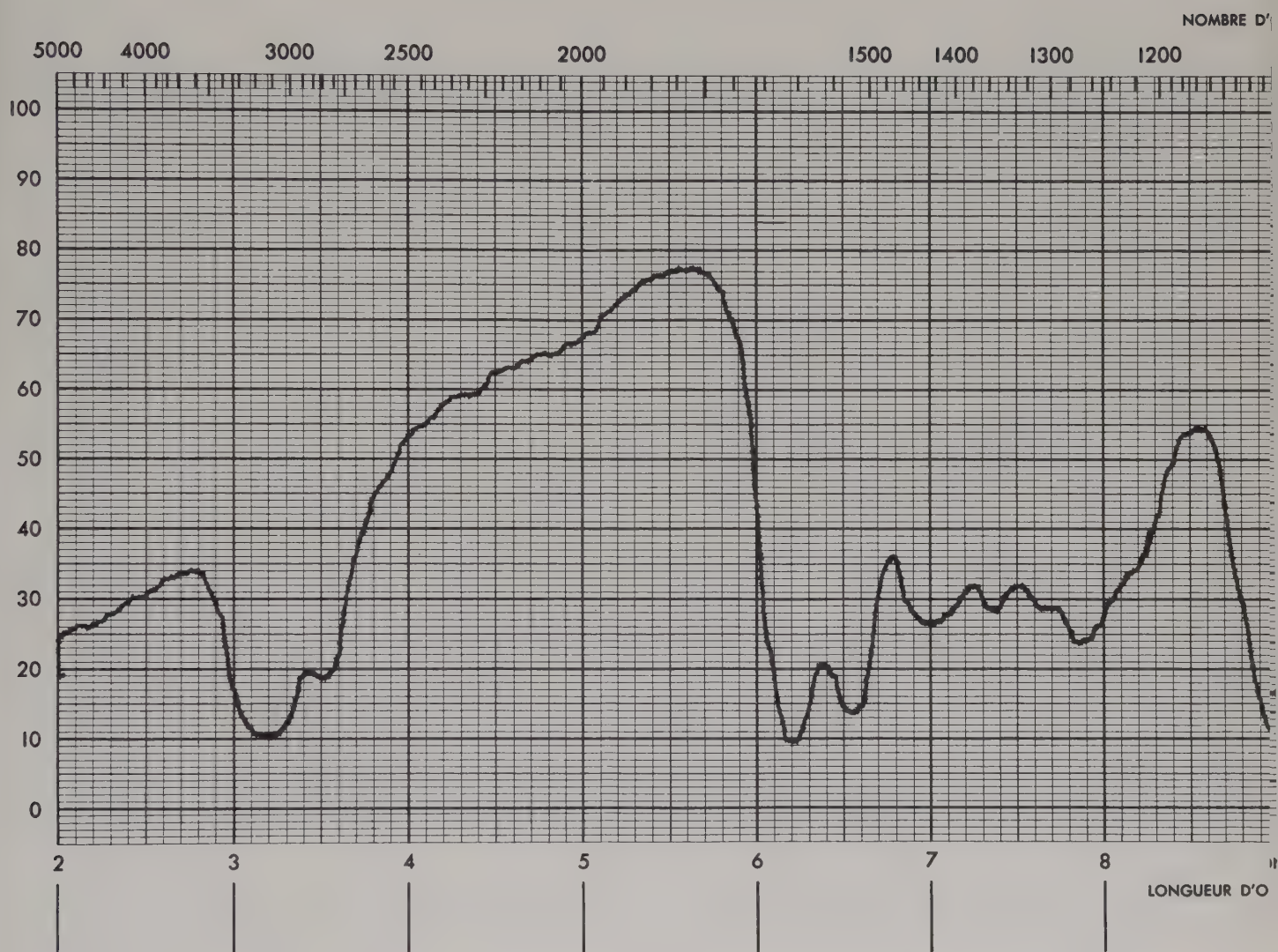
. Préparation de l'échantillon à essayer :

Nous n'avons pas utilisé pour cet essai la solution injectable, mais nous avons étudié les modifications des spectres d'une solution à 20 p 100 environ d' A.P.M.S. dans le N.H.E.L. à 70 p 100.

Le spectre 1 (Tableau N° XX) du solvant seul présente un aspect particulier mais différent de celui du spectre 2, (Tableau N° XXI) correspondant à la solution extemporanée d' A.P.M.S. et de N.H.E.L.

Nous pouvons constater dès ce moment que la nature polypeptidique du produit ne permet pas d'obtenir un spectre très fouillé et bien lisible. Néanmoins, après 10 minutes de bain-marie bouillant, le spectre complètement modifié, apparaît, (Tableau N° XXII).

L'accélération de la réaction par la température a ainsi permis de vérifier qu'il se produit une combinaison entre A.P.M.S. et N.H.E.L. sans pouvoir toutefois prouver le type de liaison créé.



ONDES CM⁻¹

1100

1000

900

800

700

650

100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

TABLEAU XX : SPECTRE IR - ATR de la NHEL

ONDE EN MICRONS

9

10

11

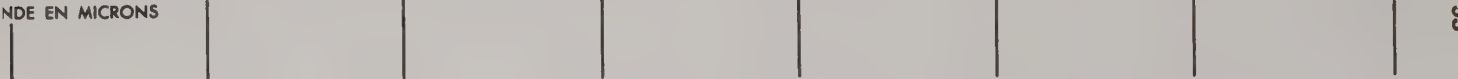
12

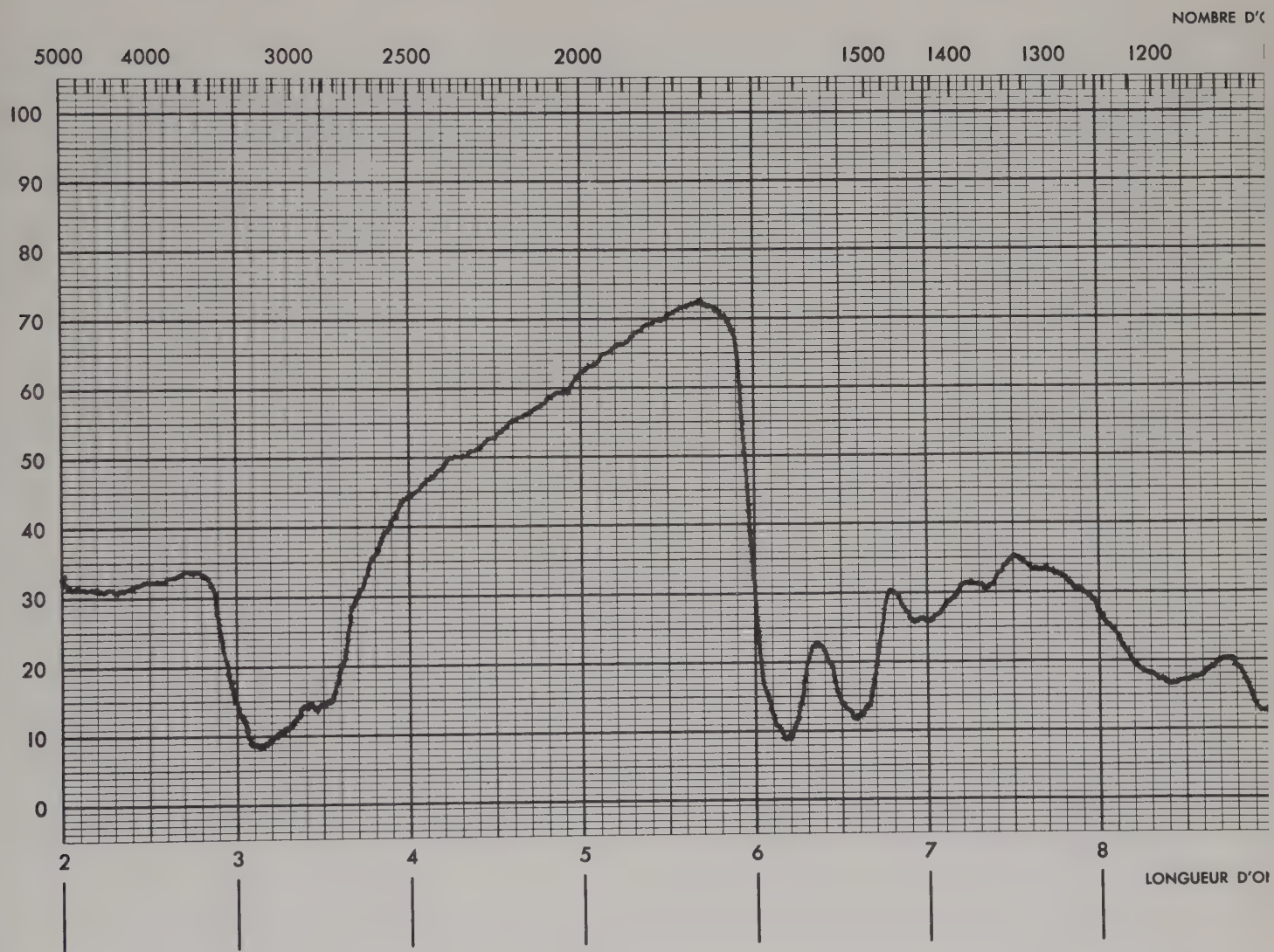
13

14

15

16





ONDES CM⁻¹

100

1000

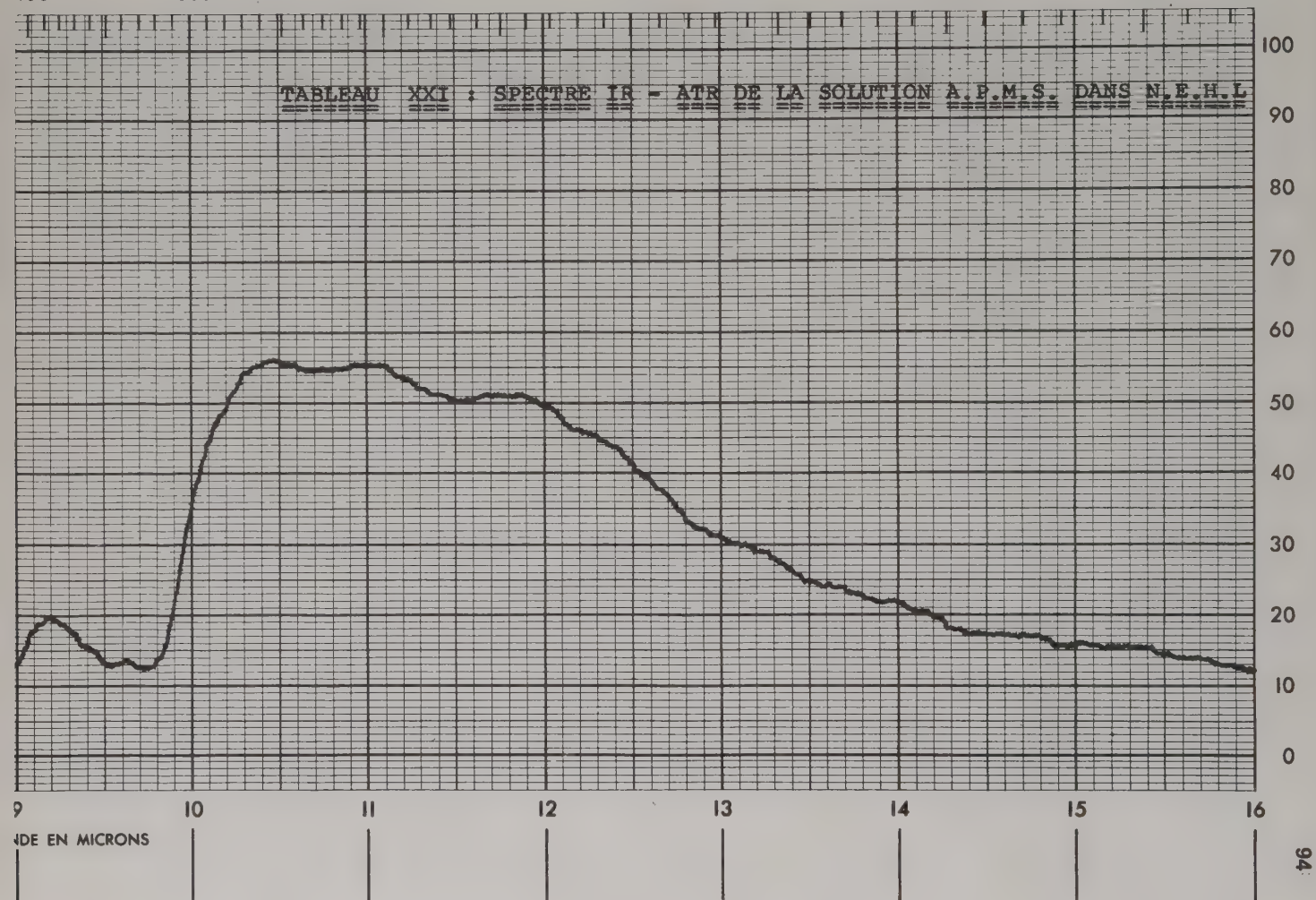
900

800

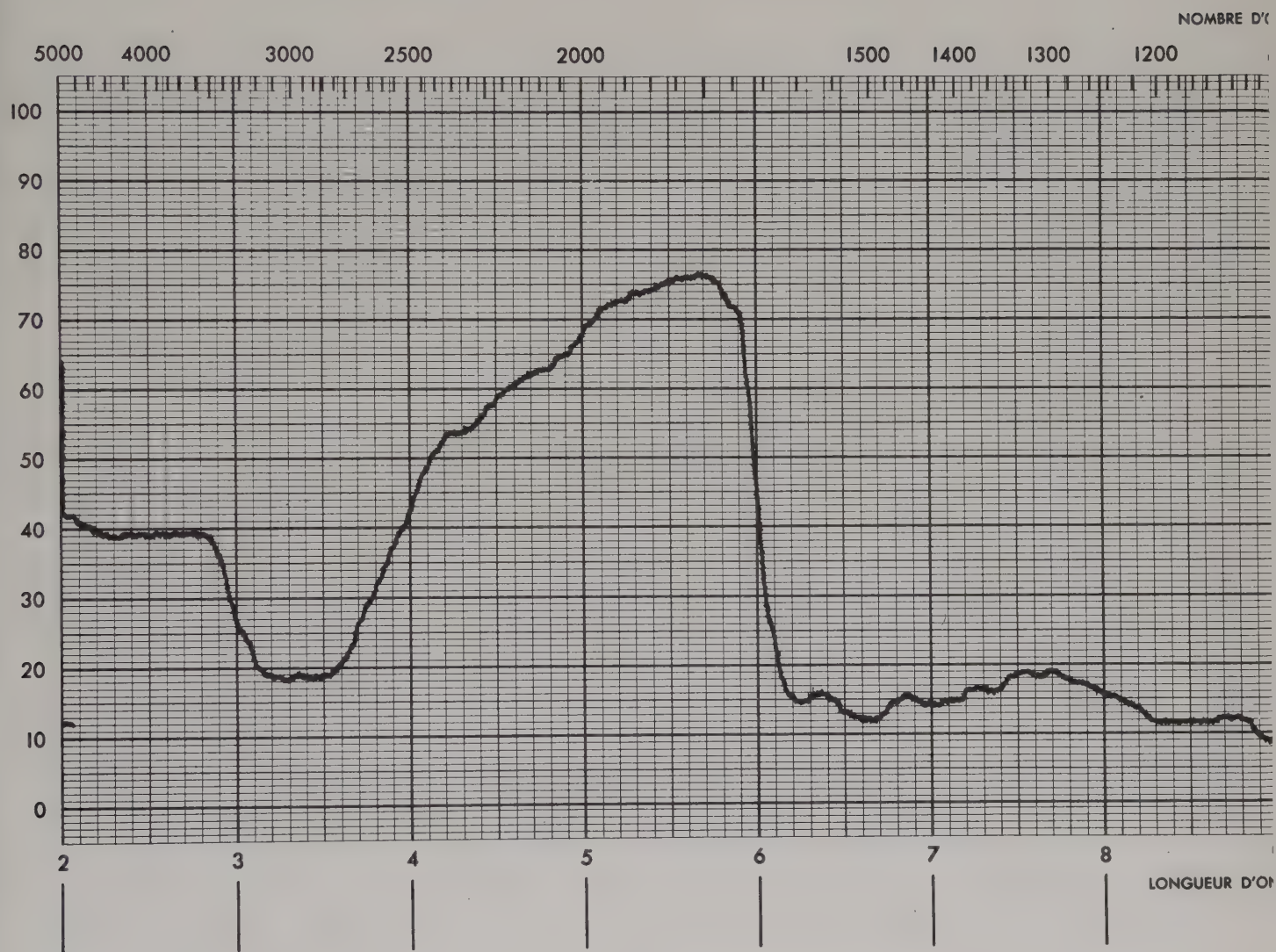
700

650

TABLEAU XXI : SPECTRE IR - ATR DE LA SOLUTION A.P.M.S. DANS N.E.H.L



DE EN MICRONS



ONDES CM⁻¹

100 1000 900 800 700 650

TABLEAU XXII : SPECTRE IR - ATR DE LA COMBINAISON A.P.M.S. - N.H.E.L



WAVELENGTH IN MICRONS

95

CHAPITRE 7 : E T U D E D E L' A C T I V I T E

A N T I B I O T I Q U E D E L A S O L U T I O N D' A. P. M. S.

T A U X S E R I Q U E S

L'étude comparée de l'activité entre A.P.M.S. et Polymyxine B a montré que, in vitro, les C.M.I. sont semblables sur différentes souches. Cette activité n'est pas modifiée pour le complexe A.P.M.S. - N.H.E.L.

Ceci nous a amené à conclure que le blocage des fonctions aminées n'agit pas sur l'activité du produit.

Certains auteurs, comme FURTADO et Collaborateurs, ont montré (43) que l'action de la Colistine Méthane Sulfonate était moins grande sur *Pseudomonas aeruginosa* in vivo, que celle du Sulfate de Colistine.

Nous avons voulu vérifier que, in vivo, les dosages étaient possibles et que même transportés par les protéines sériques, l' A.P.M.S. - N.H.E.L. agissait sur les germes.

L'utilisation du dosage bactériologique est une preuve d'activité.

L'activité d'un antibiotique dans des septicémies ou en un endroit déterminé de l'organisme, implique un taux sérique dans la partie de l'organisme à traiter, supérieur à la C.M.I. correspondant au germe en question.

Nous avons donc déterminé ces taux sanguins chez le chien, après injection intramusculaire d' A.P.M.S. dans le N.H.E.L. à la dose de 20 000 U.I/kg de poids, et chez le veau.

Ces taux sériques ont été déterminés par la méthode microbiologique à l'aide de *Bordetella bronchiseptica*, par rapport à une gamme étalon de Sulfate de Polymyxine B, selon la technique classique, (51) (87) (99).

Les prélèvements ont été faits chez le chien dans un premier essai, à 30 mn, 1 h, 1 h 30, 2 h, 2 h 30 et 3 h après injection.

Dans un deuxième essai à 1 h, 2 h, 4 h et 6 h.

Chez le veau, ils avaient été réalisés à 1 h, 2 h, 6 h et 10 h.

Dans le Tableau N° XXIII nous avons réalisé un graphique plus parlant que toutes les listes de chiffres et sur lequel nous avons ajouté la courbe des taux sériques chez l'homme, (réalisés à l'hôpital Bicêtre grâce à l'obligeance de Mr. R. Leluc).

Du fait des liaisons antibiotiques-protéines du sérum, il importe en effet de travailler dans des conditions très précises.

Classiquement, les antibiotiques sont considérés comme moins actifs quand la proportion d'antibiotique lié, est grande (17). Pour notre part, nous sommes en désaccord avec cette proposition.

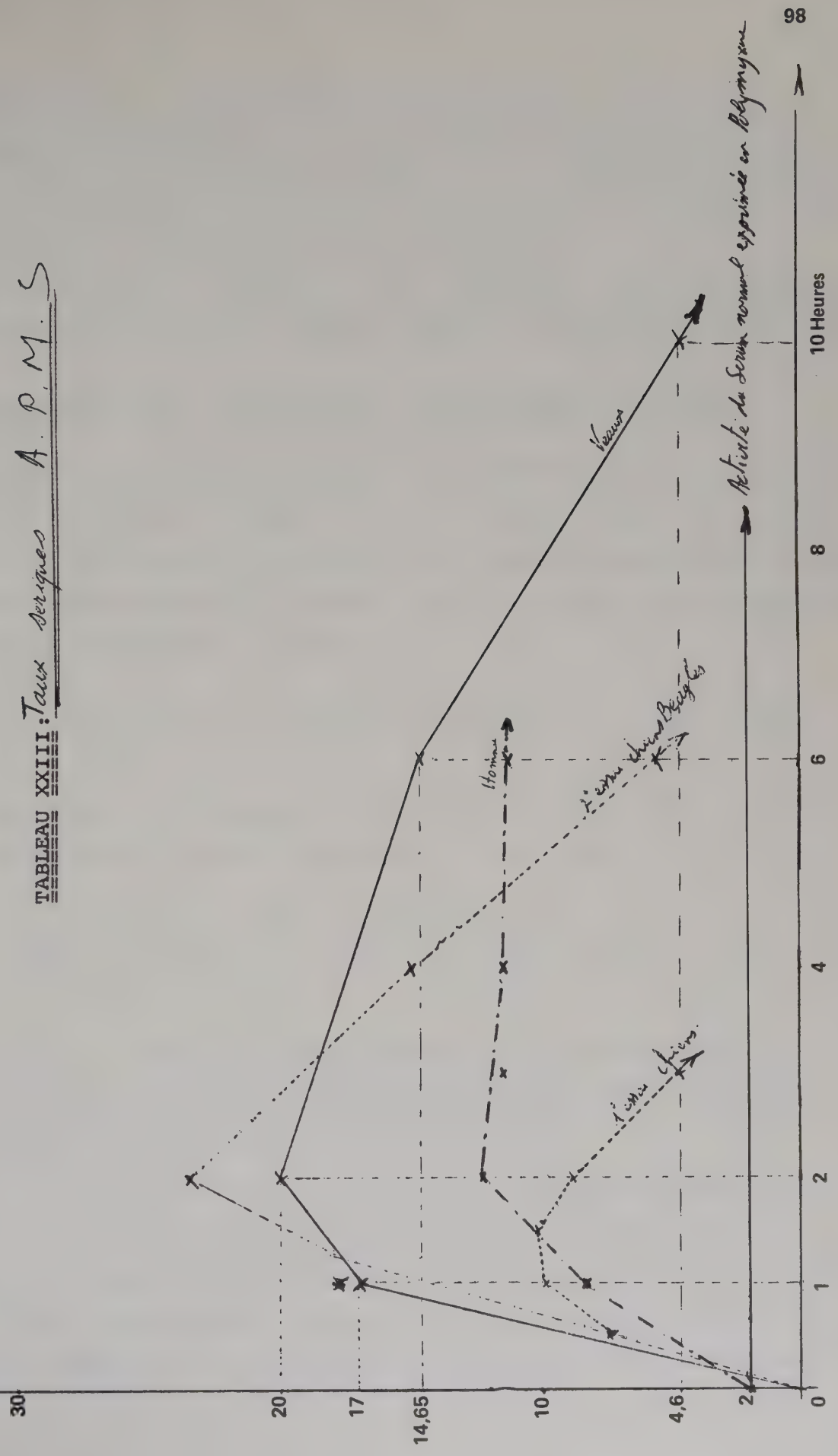
En effet, la mesure de la proportion de l'antibiotique lié avec les protéines sériques, a toujours été extrêmement grossière.

Dans l'ensemble, les techniques consistent à réaliser une ultrafiltration qui retient les protéines du sérum ainsi que les antibiotiques liés à ces protéines.

Le dosage de l'antibiotique dans le filtrat permet de déterminer la proportion d'antibiotique libre considéré comme le seul à être actif.

— : 20.000 U/kg par voie IM chez le veau : prises de sang à 1, 2, 6 et 10 heures.
 : 20.000 U/kg par voie IM chez le chien " à 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h et 3 h
 - - - - : # 7500 U/kg par voie IM chez l'homme prises de sang à 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 6 h

TABLEAU XXIII: Taux sériques A. P. M. S.

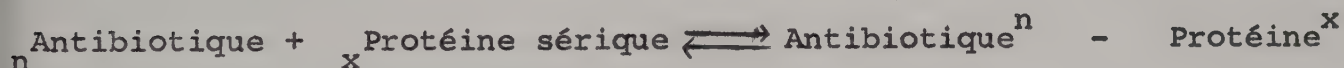


En l'absence de connaissances sur la nature des liaisons antibiotique et protéine et sur la partie de la molécule antibiotique qui agit sur le microorganisme, il est très difficile d'affirmer une inactivation de l'antibiotique par les protéines.

Tous les types de liaisons ont été envisagés, mais aucune preuve ne semble avoir été donnée, (VAN DER WAALS - Liaison Hydrogène) (52).

HYPOTHESE PERSONNELLE SUR LA FIXATION ANTIBIOTIQUE - PROTEINE :

Les antibiotiques sont fixés par les protéines selon les lois générales de la chimie, au même titre que n'importe quel métabolite introduit dans la circulation sanguine et comme n'importe quel produit chimique non biologique, et l'on peut écrire la réaction suivante sans préjuger de la nature des liaisons :



Cet équilibre est régi par la loi d'action des masses et la constante de l'équilibre est donnée par la réaction :

$$k = \frac{[\text{Antibiotique}]^n + [\text{Protéine}]^x}{[\text{Antibiotique} - \text{Protéine}]}$$

Si la partie libre de l'antibiotique est la seule active, il faudra évidemment que la concentration de celle-ci soit au moins égale à la C.M.I. correspondant au germe traité.

Cette partie libre entrant en action sera détruite au fur et à mesure ou métabolisée. Par conséquent, du fait du déplacement d'équilibre, le complexe Antibiotique - Protéine libère au fur et à mesure et dans la proportion définie par la constante d'équilibre, une certaine quantité d'antibiotique qui est alors directement actif.

Ce complexe se comporte alors plutôt comme une réserve d'antibiotique actif, voire même comme un volant d'activité de l'antibiotique.

Il n'est du reste pas du tout prouvé que la partie combinée soit inactive. Quoi qu'il en soit, dans un dosage, ce complexe intervient en ralentissant la diffusion de l'antibiotique dans la gélose, d'où la nécessité de rajouter à la gamme-étalon une quantité de sérum qui sera équivalente à celle utilisée pour les mesures ; celle-ci étant elle-même additionnée d'une manière aliquote de la substance tampon ayant servi à diluer la gamme-étalon.

A titre d'exemple, nous donnons le détail des dilutions réalisées pour notre dosage.

PARTIE EXPERIMENTALE :

Tampon pH 2 au Glycocolle

- . glycocolle 3,5 g
- . NaCl 3,0 g
- . eau Q.S.P. 1000 ml.

Ajuster à pH 2 au moyen d'HCl concentré.

Tampon pH 6

- . phosphate monopotassique 8 g
- . phosphate dipotassique 2 g
- . eau distillée Q.S.P. 1000 ml.

Solution-étalon mère

- . à 5 000 U.I/ml dans le tampon glycocolle pH 2.

Solutions-étalons filles

- . à 12 U.I/ml dans le tampon pH 6
- . à 30 U.I/ml dans le tampon pH 6
- . à 75 U.I/ml dans le tampon pH 6.

Gamme-étalon en sérum

Solutions filles	à 12 U.I/ml	à 30 U.I/ml	à 75 U.I/ml
Volumes versés	1	1	1
Tampon pH 6	1	1	1
Sérum témoin	1	1	1
Dilutions finales	4 U.I/ml	10 U.I/ml	25 U.I/ml

Solutions à doser

Les sérums sont dilués au 1/3 en tampon pH 6. Le reste du dosage se fait comme pour le produit pur sur Bordetella bronchiseptica et la sensibilité de la méthode est de 0,3 U.I/ml.

Résultats obtenus

Des injections ont été réalisées sur des chiens par voie I.M.

Chaque fois nous leur avons injecté 20 000 U.I/kg du complexe A.P.M.S. - N.H.E.L.

Le tableau XXIII présente une courbe qui résume les résultats obtenus. Comme nous l'avons déjà dit précédemment, chez chiens et veaux, les injections I.M correspondaient à une dose de 20 000 U.I/kg.

Chez l'homme, les essais ont été réalisés après piqure I.M à la concentration d'environ 7 500 U.I/kg. La dose utilisée était donc près de trois fois inférieure à celle injectée aux divers animaux.

Les résultats obtenus montrent que les réponses des divers organismes sont nettement différentes, cette différence entre espèces n'est évidemment pas à prouver. L'élimination de l' A.P.M.S. varie selon chacune des trois espèces en expérimentation.

C O N C L U S I O N S

Au cours de ce travail, nous avons d'abord exposé des généralités sur les Polymyxines et les dérivés Méthanesulfoniques utilisés couramment. Nous avons montré les inconvénients que les procédés classiques de fabrication apportaient dans le cas de l'application de la méthode à la Polymyxine B.

Nous avons été ainsi amené à réaliser un Acide Polymyxine Méthylène Sulfonique (A.P.M.S.).

Nous décrivons les méthodes analytiques qui nous ont permis de juger de sa qualité et de suivre sa fabrication. Cette étude analytique fait appel à des procédés :

- . chimiques classiques d'analyse élémentaire,
- . physicochimiques de séparation et d'identification,
- . biologiques pour la détermination de son activité antibiotique et de sa toxicité.

Nous exposons enfin les divers essais de fabrication réalisés pour ce produit et nous montrons comment les considérations analytiques décrites précédemment nous ont amené à définir un procédé définitif.

Un autre chapitre étudie la mise en forme galénique et montre là encore, le rôle de l'analyse dans la découverte du complexe A.P.M.S. - N.H.E.L.

Et enfin nous abordons dans le dernier chapitre l'étude de l'activité in vivo de l' A.P.M.S. et de sa vitesse d'élimination chez diverses espèces animales.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 . AINSWORTH (G.C.), BROWN (A.M.) and BROWNLEE (G.).

"Aerosporin, an antibiotic produced by Bacillus aerosporus Greer".

Nature 1947 - 160 - 263.

- 2 . ALVAREZ UDE (F.).

"La Colimycine, Pharmacologie et Clinique".

Fiches Médicales 1960 - XII 266 - Col. 32.

- 3 . AMERICAN CYANAMID COMPANY.

"Procédé de préparation d'une nouvelle substance bactéricide par la culture de Bacillus polymyxa sous forme pure, de sels et de dérivés".

Brevet français N° 1.018760 - Gr 19 - CP.4 du 19 Avril 1948.

- 4 . ANONYME.

"Colistine".

Thérapie 1968 - 13 - p 130 - 160.

- 5 . ANONYME.

"La Polymyxine B".

Thérapie 1956 - 11 - N° 5 p 994, 11 à 19.

- 6 . ANONYME.

"Sodium Colistiméthate".

The Medical letter 1968 - 10 p 257.

- 7 . BARNETT (M), BUSHBY (S.R.M.) and WILKINSON (S).
"Sodium sulfomethyl derivatives of Polymyxins".
Brit. J. Pharmacol. 1964 - 24 - 552 - 574.
- 8 . BELL (P.H.) et Collaborateurs.
"Chemical studies on Polymyxin : comparison with Aerosporin".
Ann. of the N-Y Acad. of Sciences, 1949 - 51 p 897-908.
- 9 . BELLAMY (L.J.).
"The infrared spectra of complex molecules".
London - New-York : John Willy and Sons Inc.
- 10 . BENEDICT (R.G.) and LANGLYKKE (A.F.).
"Antibiotic activity of Bacillus polymyxa".
J. Bact. (1947) - 54 - 24.
- 11 . BENEDICT (R.G.) and STODOLA (F.H.).
"Effect of various factors on the production of Polymyxin".
Ann. N-Y Acad. of Sciences 1949 (51) p 866 - 874.
- 12 . BISERTE (G) et DAUTREVAUX (M).
"Structure de la Polymyxine B".
Bull. Soc. Ch. Bio. 1957 - 39 - 795 à 812.
- 13 . BLAUSTEIN (A).
"Studies on Sodium Colistinmethanesulfonate, including a comparative study of its effect on Gram negative organism".
Antibiotics annuals 1959 - 1960 p 75-76.

- 14 . BLISS (E.A.), CHANDLER (C.A.) et SCHOENBACH (E.B.).
"In vitro studies of Polymyxin".
Anal. N-Y Acad. Sci. 1949 - 51 - 944.
- 15 . BOGER (W.P), GAVIN (J.J.).
"Absorption, excretion and distribution of Colistin".
Antimicrobial agents and chemotherapy 1961 p 429.
- 16 . BOISSIER (J.R.), PHILIPPE (J), ZUCKERKANDL (F), ORES (B),
TEILLON (J), DUMONT (C) et Mlle BOILOT (Y).
"Préparation de nouveaux dérivés détoxifiés d'antibiotiques
basiques".
C.R. Acad. Sciences 1959 - 249 - 1415.
- 17 . BRODIE (B.B.).
"Pharmacological and clinical implications of drug transport".
p. 137 - 145.
- 18 . BROWNLEE (G.).
"Antibiotics derived from Bacillus polymyxa".
Ann. N-Y Acad. Sc. 1949. 51 p 875 - 878.
- 19 . BROWNLEE (G.).
"Remarks on clinical results with Polymyxin A and B".
Annals of the N-Y Acad. of Sc. 1949 - 51 p 998 - 1000.
- 20 . BROWNLEE (G.), BUSHBY (S.R.M.) and SHORT (E.I.).
"Comparative biological studies of Polymyxin A and Polymyxin D".
Annals of the N-Y Acad. of Sc. 1949 - 51 p 891 - 896.

- 21 . BROWNLEE (G.), BUSHBY (S.R.M) and SHORT (E.I.).
"The pharmacology of Polymyxin A, B, and D."
Ann. of the N-Y Acad.of Sc. 1949 - 51 p 952 - 967.
- 22 . BRYER (M.S.) SHOENBACH (E.B.) and BLISS (E.A.)
"Pharmacology of Polymyxin".
Ann. of the N-Y Acad. of Sc. 1949 - 51 p 935 - 943.
- 23 . BUSHBY (S.R.M) and GREEN (A.F.).
"The relase of Histamin by Polymyxin B and Polymyxin E".
Brit. J. of Pharmacology. (1955) 10 215 - 219.
- 24 . Mc CABE (W.R.), JACKSON (G.G.) and KOSIS (W.M).
"Clinical and laboratory observations on the use of Colistin in infections by Gram negative Bacilli".
Antibiotics annual 1959-1960 p 80 - 88.
- 25 . CARROLL (G.) and MALETTE (W.T.).
"The use of Colymycin in chronic urinary infections due to Pseudomonas aeruginosa". (From St John's hospital, St-Louis).
The Journal of Urology 85 1961 p 86 to 88.
- 26 . CARTER WILLIAM (M.D.) and Mc CARTY KENNETH (S).
"Molecular mechanisms of antibiotic action".
Annals of internal medicine 1966 - 64 N° 5 - p 1087 - 1113.
- 27 . CATCH (J.R.), JONES (T.S.G.), WILKINSON (S).
"The chemistry of Polymyxin A".
Annals of the N-Y Acad. of Sc. 1949 51 p 917-923.

28 . CAUJOLLE (F) et Collaborateurs.

"Toxicité et aptitudes pharmacologiques du Diméthyl sulfoxyde".

C.R. Acad. Sc. Paris 1258 (17 Février 1964) - Groupe B.

29 . CHABBERT (Y), MONNIER (J) et Collaborateurs.

"Colistine".

Path. Biol. 1961 - Vol 9 - 2123 - 2125.

30 . CHABBERT (Y.), et LE MINOR (L.).

"Transmission de la résistance à plusieurs antibiotiques chez les enterobactériacées".

I - Définition : Bactériologie générale du transfert.

La Presse Médicale 1966, 74, N° 47 p 2407 - 2410.

31 . CHABBERT (Y.) et LE MINOR (L.).

"Transmission de la résistance à plusieurs antibiotiques chez les entero-bactériacées".

II - Bactériologie générale de la résistance.

La Presse Médicale 1966, 74 - N° 48 p 2479 - 2483.

32 . CHABBERT (Y.A.)

"L'antibiogramme, sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques".

Editions de la Tourelle - 5, rue Guynemer - 75 - ST-MANDE.

33 . CHABBERT (Y.A.) et PATTE (J.C.).

"Type et caractères de la résistance bactérienne à la Colistine".

Annales Inst. Pasteur 1961, 100 p 44 - 52.

- 34 . COTTY (V.F.) and HARRIS (A.F.).

"Action of Polymyxin and compound 48/80 on calcification in vitro".

Arch. Int. Pharmacodyn. 1969, 178 p 331-338.

- 35 . CRAIG (L.C.).

"Antibiotic polypeptides".

Proceeding of the Third Intern. Congress of Biochemistry.

Brussels - 1955 - p 416 à 420.

- 36 . CRAIG (L.C.).

"Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies (separation by counter-current distribution)".

J. Biol. Chem. 155 p 519 - 534.

- 37 . CROSS A.D. (Traduit par Claude ROCCHICCIOLI).

"Introduction à la pratique de la spectroscopie infra-rouge".

Azoulay Editeurs - Paris 1967.

- 38 . CUTHBERT (M.F.).

"Colistin and Polymyxin".

The Lancet 1962 - I - p 383.

- 39 . EISTERT BERND (Dr.) traduit par G. GUILLOT - URBAIN et
O. FATIANOFF.

"Tautométrie et Mésomérie".

Presses universitaires de France - 1949.

- 40 . EVANS (R.M.).

"The chemistry of the antibiotics used in Medicine".

Pergamon press - 1965.

- 41 . FEW (A.V.) and SCHULMAN (J.H.).
"Unimolecular films of Polymyxins A, B, D and E at the
air-water interface".
Biochem. J. (1953) 54 171.
- 42 . FORNI (P.V.), MOIRAGHI, RUGGENINI.
"Interazioni antibiotiche della Colimicina".
Minerva Medica 1958 - 49 - 4539 - 4540.
- 43 . FURTADO (D) and Coll.
"In vitro and in vivo effectiveness of the antibiotic Colistin
in preventing the growth of Pseudomonas aeruginosa".
J. Path. Bact. 1968 - 96 (1) - 57-63.
- 44 . GALE
"The nature of the selective toxicity of antibiotics".
Brit. Med. Bull. (1960) 16 - 11.
- 45 . GANTES (P.), BARAT (J.), JOLY (H.)
"Nouveau procédé de fabrication des dérivés méthylsulfoniques
d'antibiotiques polypeptidiques".
Chimie thérapeutique (1970) V N°2 - p. 146-149.
- 46 . GIROUX (J), et BEAULATON (I.S.).
"Toxicité aiguë du Méthane Sulfonate de Colistine chez la
souris et chez le rat".
Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier 1962 - 22
p. 49 - 54.

- 47 . GORE (RC) and PETERSEN (E.M.).
"Infrared studies".
Annals N-Y Acad. of Sc. 1949 - 51 p 924 - 934.
- 48 . GRABER (CD), TUMBUSCH (WT) and VOGEL (EH).
"In vitro sensitivity of Pseudomonas from burned patients to Colistin sulfate".
Antib. Ann. 1959 - 1960 p 77-79.
- 49 . GREENGARD (J.) and ALISEDA (A.F.).
"Treatment of acute diarrheas of infancy with oral Colistin sulfate".
Antibiotics Annuals 1959-1960 - p. 101-106.
- 50 . GROBUIIS (S.).
"Les accidents du Méthane sulfonate de Colistine".
La vie médicale 1967 - 48 - 301.
- 51 . GROVE C. Donald and RANDALL A. William.
"Assay methods of antibiotics".
Medical encyclopedia Inc. 1955.
- 52 . GUILLOT (M.H.).
"Bonds between proteins and carried molecules p 13 à 18".
Extrait de "Transport function of Plasma proteins" par
P. DESGREZ et P.M de TRAVERSE.
- 53 . HALPERN (G.)
"Thèse de Doctorat en Médecine - Paris 1964 : Etude
expérimentale et clinique des propriétés histaminolibératrices
de la Colistine ou Colimycine".

- 54 . HARADA (M), TAKEUCHI (M), and KATAGIRI (K).
"Effect of antibiotics on vascular permeability".
J. of antibiotics (Tokyo) 1967 - 20 - 369 - 73.
- 55 . HAUSMANN and CRAIG.
"Polymyxin B₁ fractionation, molecular weight determination,
aminoacid and fatty acid composition".
J. Amer. Chem. Soc. 1954 - 76 - 4892.
- 56 . HEDBERG (M.) and Coll.
"Effectiveness of Acetic acid, Betadine, Amphyll, Polymyxin B,
Colistin, and Gentamycin against "Pseudomonas aeruginosa".
Appl. Microbiol. 1969 - 18 - 854 - 856.
- 57 . HIRSCH (H.A.), Mc CARTHY (C.G.) and FINLAND (M.).
"Polymyxin B and Colistine - Activity, resistance and cross
resistance in vitro".
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1969 - 103 - 338.
- 58 . HOTCHKISS R.D.
"Gramicidine, Tyrocidine et Tyrothricine".
Advances Enzymiolog. 1944 - 4 - 153.
- 59 . HOWLETT (R. Margaret) and SELZER (B.Georges).
"The identification of Colistin and Polymyxin B by thin
layer chromatography".
Journal Chromatog. 30 (1967) - 630-631.

60 . HUTINEL B.

"La Colimycine - Etude expérimentale. Intérêt clinique par voie parentérale".

Thèse Doctorat en Médecine (Diplôme d'Etat) présentée et soutenue le 26 Novembre 1958.

61 . IGLOY M. and MIZSEI A.

"Separation of Polymyxin B, D, E, and M by thin layer chromatography".

J. Chrom. 28 (1967) - 456-458.

62 . IGLOY M. and MIZSEI A.

"Investigation of Polymyxin E derivatives by thin-layer chromatography".

J. Chromatog. 34 (1968) - 546-547.

63 . IVASHKIV Eugène.

"Separation and determination of Polymyxin B in formulations".

J. Pharm. Sc. 1968 - 57 p 642-643.

64 . JAWETZ (E.) and COLEMAN (V.R.).

"Laboratory and clinical observations on aerosporin, (Polymyxin B)".

Journal Lab. Clin. Med. 1949 - 34 - 751 - 760.

65 . JONES (S.G. Tudor).

"Chemical evidence for the multiplicity of the antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*".

Annals of the N-Y Acad. of Sci. 1949 - 51 p 909 à 916.

- 66 . KAGAN (B.M), DREVSKY (D.), MILZER (A.), and LOCKE (M).
"Polymyxin B and Polymyxin E".
J. Lab. Clin. Med. 1951 - 37 - 402 - 414.
- 67 . KAPLAN (S.), FISCHER (A.E.) and KOHN (J.L).
"Treatment of Pertussis with Polymyxin B (aerosporin).
Journal Pediatr. 1949. 35 p 49 - 57.
- 68 . KENDALL N. David.
"Applied infrared spectroscopy".
Reinhold publishing corporation 1966.
- 69 . KIMURA Y. and Coll.
"Polymyxin P - New antibiotics of Polymyxin group".
The journal of antibiotics 1969 XXII - N° 9 - 449-450.
- 70 . LACHAUX (M.)
"Solvants non aqueux injectables".
Il Farmaco VII - 1952 - 324-343.
- 71 . LARSON (C.L.), CARLE (B.N.) and VERDER (A.E.).
"The effect of Polymyxin in the treatment of experimental
Brucellosis and Tularemia".
Annals of the N-Y Acad. of Sc. 1949 - 51 p 982 - 986.
- 72 . LATTERADE (C.) et MACHEBOEUF (M.).
"Recherches biochimiques sur le mode d'action de la Polymyxine".
Annales Inst. Past. 1950. 78 p 753-758.

- 73 . MANNICH (C.) et KROSCHE (W.).
"Sur un produit de condensation du formaldéhyde de
l'ammoniaque et de l'antipyrine".
Arch. Pharm. 1912 - 250 - 647-667.
- 74 . MARTIN (R.), SUREAU (B.), CHABBERT (Y.), et Collaborateurs.
"La Colimycine".
Actualité Thérapeutique 1959 - P. 161-171.
- 75 . MIOCQUE M.
"Les réactions d'aminoéthylation selon Mannich".
Annales Pharm. françaises 1969 - 27 p 381-392.
- 76 . MURDOCH (McC) (Edimburg).
"The treatment of severe Pseudomonas Pyocyanea infections
with Colistin".
Third International Congress of Chemotherapy. 22-27 July
1963. Stuttgart (Germany) C₆.
- 77 . MUSCHEL (L.H.), AHL (L.A.), FISCHER (M.W.).
"Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to normal serum and to
Polymyxin".
Journal of Bacteriology 98 - 1969 - 453-457.
- 78 . NASH and SMASHEY (A.R.).
"Applications of buffered paper strips to the chromatography of
Polymyxins".
Arch. Bioch. 1951 - 30 - 237-240.

- 79 . NAUMANN (P.) et AUWARTER.
"L'administration parentérale de la Colistine".
"Taux de principe actif et activité antibactérienne".
Third International Congress of Chemotherapy 22 - 27. July 1963.
Stuttgart.
- 80 . NEWTON (B.A.)
"The mode of action of Polymyxin".
Proceeding of the Third Int. Congress of Biochemistry.
Brussels 1955. p 423-424.
- 81 . NEWTON (B.A.)
"The properties and mode of action of the Polymyxins".
Bact. Rev. 1956 - 20 - 14-27.
- 82 . NORD (N.M) and HOEPRICH (P.D.).
"Comparison of Polymyxin B and Colistin".
Clin Research 1963 - 11 p 81.
- 83 . OLIVER (A.J.)
"Colistin and Polymyxin".
The Lancet 1962 - I. 539.
- 84 . PATTE (J.C.) et CHABBERT (Y.A.).
"Modalités d'action antibactérienne de la Colistine".
Annales de l'Institut Pasteur 1961 100 p 32-43.

- 85 . PATTE (J.C), HIRSCH (H.) et CHABBERT (Y.)
"Etude des courbes d'effet bactériostatique des associations
d'antibiotiques".
Annales Institut Pasteur 1958 - 94 - 621-635.
- 86 . PORTER (J.N.), BROSHARD (R.), KRUPKA (G.), LITTLE (P.), and
ZELLAT (J.S.).
"Isolation and production of Polymyxin".
Annals N-Y Acad. Sc. 1949 - 51 p 857-865.
- 87 . REESE (E.T.) and EISENBERG (G.M.).
"Polymyxin : Assay - Procedures".
Annals of the N-Y Acad. of Sc. 1949 - 51 p 968-979.
- 88 . RINEHART (K.L. jr), WOO (P.W.K.), ARGOUDELIS (A.D.)
and GIESBRECHT (A.M.)
"Chemistry of the Neomycin - I) A partial structure for
Neobiosamines B and C".
Journal Amer. Chem. Soc. 1957 - 79 4567 - 8.
- 89 . ROBERTS (C.E.), KIRBY (W.M.M.).
"Colistin in the treatment of hospitalized patients with
Pseudomonas infections".
Antimicrobial agents annual 1960.

90 . ROSS (S.), PUIG (J.R.) and ZAREMBA (E.A.).

"Colistin : Some preliminary laboratory and clinical observations in specific gastro-enteritis in infants and children".

Antib. Ann. 1959-1960 p 89-100.

91 . RUSSEL (A.P.)

"Penicillins, cephalosporins and polypeptides antibiotics".

Antibiotics to-day.

The pharmaceutical Journal 1968 - p. 109-112.

92 . SCHOENBACH (E.B.), BRYER (M.S.) and LONG (P.H.).

"The clinical use of Polymyxin".

Annals of the N-Y Acad. of Sc. 1949 - 51 p 987-997.

93. SCHULMAN (J.H.), PETHICA (B), FEW (A), and SALTON (J.T.).

"The physical chemistry of Hoemolysis and bacteriolysis by surface active agents and antibiotics".

Prog. Biophys. 1955, 5 , 41-71.

94 . SCHWARTZ (B.S.), WARREN (M.R.), BARKLEY (F.A.) and LANDS (L.).

"Microbiological and pharmacological studies of Colistin Sulfate and Sodium Colistin - Methane sulfonate".

Antibiotics annual 1959 - 1960 p 41-60.

95 . SELYE (H.), TUCHWEBER (B), and CARUSO (P.L.).

Topical resistance to Mastocalcergy".

Journal Pharm. Exp. Therap. 1964 - 146 p 252 - 257.

- 96 . SILAEV (A.B.), STEPANOV (V.M.) et Collaborateurs.
"Chimie de la Polymyxine M. Composition qualitative en aminoacides".
Antibiotiki - 31 - 1961 - 297-305.
- 97 . SIMEON de BUOCHBERG.
"La Colistine Méthane Sulfonate de Sodium".
Doctorat d'Université de Pharmacie de Montpellier (Déc. 1968).
- 98 . STAINIER (R.Y.), PALLERONI (N.J.) and DOUDOROFF (M.).
"The aerobic Pseudomonas, a toxonomic study".
J. Gen. Microbiol. 1966 - 43 159-271.
- 99 . STANSLY (P.G.)
"A simple method for the Assay of Polymyxin in Blood and Urine".
Ann. of the N-Y Acad. of Sc. 1949 - 51 p 980-981.
- 100 . STANSLY, SHEPHERD and WHITE.
"Polymyxin : a new chemotherapeutic agent".
Bull. John Hopkins Hosp. (1947) 81 - 43.
- 101 . STEWART (G.T.).
"Colistin and Polymyxin".
The Lancet 1962 - I - 326-327.
- 102 . SUMIO UMEZAWA.
"Procédé de préparation de nouveaux dérivés d'antibiotiques bases solubles dans l'eau."
Brevet français PV N° 8-12-756 - N° 1-298-907. A 61 k CO 7 d
du 11 Décembre 1959.

103 . SURREY R. Alexander.

"Name reactions in organic chemistry".

Academic press 1961.

104 . UNITED STATES PATENT OFFICE.

"Method of preparing Polymyxin by :

Philip G. STANSLY, Robert G. SHEPHERD and Robert WINTERBOTTOM, -
STAMFORD (Conn.) - assignors to American Cyanamid Company,
NEW-YORK, N.Y., a corporation of Maine.

Patented June 10 - 1952 - N° 2 - 599 - 950.

Application April 30, 1947, Serial N° 744 - 940.

105 . VOGLER (K), STUDER (R.O), LANZ (P.), LERGIER (W.), BOHNI (E.)
und FUST (B.).

"Synthesen in der Polymyxin - Reihe.

Synthese des Rochaktiven cyclischen decapeptides 7 γ und sein
vergleich mit natürlichem Polymyxin B".

Helvetica chimica acta (1963) XLVI Fascicule VII - N° 316
p 2823 à 2843.

106 . VOGLER (K) und CHOPARD-DIT-JEAN (L.H.)

"Synthese eines Dipeptid-fragmentes mit (+) - Isopelargonsäure".

Helvetica chimica acta XLIII p 279-286.

107 . WAHN (K), LUTSCH (G), ROCKSTROH (T) and ZAPF (K).

"Morphological and Physiological investigations on the action of
Polymyxin B on Escherichia coli".

Arch. Microbiol. 1968 - 63 - 103-6

- 108 . WEILL (M.), DEGENNE (S.) et GAUTHIER-LAFAYE (J.P.)
"A propos de quatre cas de curarisation par la Colimycine".
Cahier d'anesthésiologie 1968 - 16 p 819.
- 109 . WELLCOME FOUNDATION LIMITED
"Médicament à base d'une sulfométhyl-polymyxine".
Brevet français N° 3405 M A 61 k - C 07 g. PV N° 9668 18 du
10 Mars 1964.
- 110 . WELSCH (M.)
"Lysis by agents of microbial origin".
Journal Gen. Microbiol. 1958. 18 . 491-497.
- 111 . WHITE (H.J.), ALVERSON (C.M.), BAKER (M.J.) and JACKSON (E.R.).
"Comparative Biological studies of Polymyxin and Aerosporin".
Annals N-Y Acad. Sc. 1949 - 51 p 879-890.
- 112 . WILKINSON (S.).
"Identification of the Polymyxins".
Antimicrob. agents and chemotherapy 1966 p 651 à 654.
- 113 . WILKINSON (S.).
"Crystalline derivatives of the Polymyxins and the identification
of the fatty acid component".
Nature (1949) 164 p. 622.

114 . WILLEMART A. et CHAUX R.

"Les grandes fonctions de la chimie organique".

115 . WILLSON (J.E.), BROWN (D.E.) and TIMMENS (E.K.).

"A toxicologic study of dimethylsulfoxide".

Tox. and Applied Pharmacology 7 - 1965 - 104-112.

116 . WRIGHT (W.W.), WELCH (H.).

"Chemical, biological and clinical observations on Colistin".

Antibiotics annual 1959-1960 p 61-74.

R E P E R T O I R E D E S T A B L E A U X

		<u>Pages</u>
TABEAU	I : Formule développée de la Polymyxine	17
TABEAU	II : Exemple de quelques antibiotiques polypeptidiques cycliques	18
TABEAU	III : Composition des Polymyxines en acides aminés	23
TABEAU	IV : Structure des Kanamycines	34
TABEAU	V : Titres biologiques comparés du Sulfate de Polymyxine B et de l' A.P.M.S. correspondant	39
TABEAU	VI : Résultats chimiques concernant quelques lots d' A.P.M.S.	41
TABEAU	VII : Spectre I.R. de Polymyxine B	43
TABEAU	VIII : Spectre I.R. d' A.P.M.S.	44
TABEAU	IX : Chromatographie sur couches minces de quelques antibiotiques	48
TABEAU	X : Chromatographie sur couches minces de Polymyxine et d' A.P.M.S.	49
TABEAU	XI : Séparation chromatographique de la Polymyxine E et de son méthane sulfonate	51
TABEAU	XII : Séparation chromatographique Polymyxine B A.P.M.S.	53
TABEAU	XIII : Séparation électrophorétique Polymyxine B A.P.M.S.	55
TABEAU	XIV : Tableau comparatif des C.M.I. de Polymyxine B et d' A.P.M.S.	60
TABEAU	XV : Comparaison des constantes de diffusion en gélose Polymyxine et A.P.M.S.	65
TABEAU	XVI : Toxicités de Polymyxine et Méthanes sulfonates ...	69
TABEAU	XVII : Détermination d'une D _l 50	72

Pages

TABLEAU	XVIII : Variations du pH au cours de la méthylolation	78
TABLEAU	XIX : D1 50 de 1' A.P.M.S. et de 1' A.P.M.S. - N.H.E.L.	90
TABLEAU	XX : Spectre I.R. - A.T.R. de la N.H.E.L.	93
TABLEAU	XXI : Spectre I.R. - A.T.R. de la solution A.P.M.S. dans N.H.E.L.	94
TABLEAU	XXII : Spectre I.R. - A.T.R. de la combinaison A.P.M.S. - N.H.E.L.	95
TABLEAU	XXIII : Taux sériques d' A.P.M.S. chez plusieurs espèces animales	98

T A B L E D E S M A T I E R E S

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	13
CHAPITRE 1 :	
. GENERALITES SUR LES POLYMYXINES	16
. LES DERIVES METHYLSULFONIQUES	26
. METHODES CLASSIQUES DE PREPARATION DE CES DERIVES	31
CHAPITRE 2 :	
. ANALYSE CHIMIQUE DE L'A.P.M.S.	37
CHAPITRE 3 :	
. ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DE L'A.P.M.S.	56
CHAPITRE 4 :	
. ANALYSE TOXICOLOGIQUE DE L'A.P.M.S.	67
CHAPITRE 5 :	
. PROCEDE DE FABRICATION DE L'A.P.M.S.	74
CHAPITRE 6 :	
. MISE EN FORME GALENIQUE DE L'A.P.M.S.	85
CHAPITRE 7 :	
. ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE LA SOLUTION D' A.P.M.S. - TAUX SERIQUES	96
CONCLUSIONS.....	102
BIBLIOGRAPHIE	103
REPERTOIRE DES TABLEAUX	122
TABLE DES MATIERES	124

